
TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Studijní program: N2612 – Elektrotechnika a informatika

Studijní obor: 3901T025 – Přírodovědné inženýrství

Technologický návrh biofilmového reaktoru s nanovlákněným nosičem pro čištění průmyslových odpadních vod

Technological Design of Biofilm Reactor with Nanofibre Carrier for the Treatment of Industrial Wastewaters

Diplomová práce

Autor: **Křiklavová Lucie**

Vedoucí BP/DP práce: Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

Konzultant: Doc. Dr. Ing. Miroslav Černík, CSc.

V Liberci 29. 5. 2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie KŘIKLAVOVÁ**

Studijní program: **N2612 Elektrotechnika a informatika**

Studijní obor: **Přírodovědné inženýrství**

Název tématu: **Technologický návrh biofilmového reaktoru
s nanovlákněným nosičem pro čištění průmyslových
odpadních vod.**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracování odborné rešerše pro oblasti biodegradace biofilmovými mikroorganismy, čištění odpadních vod, aplikace biofilmových reaktorů, obrazová analýza biofilmů.
2. Návrh a ověření základních technologických parametrů (doba zdržení odpadní vody, teplota).
3. Dlouhodobý provoz laboratorních modelů biofilmových reaktorů s komerčně dostupným nosičem a nově vyvíjeným nanovlákněným nosičem.
4. Identifikace limitních stavů technologických parametrů a koncentrace kontaminantů.
5. Optimalizace technologie se zaměřením se na kyanidy a anilín.


Rozsah grafických prací: 20 stran
Rozsah pracovní zprávy: 40-60 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

- Čejková A., Masák J., Jirků V., Veselý M., Pátek M., Nešvera J. : Potential of Rhodococcus erythropolis as a bioremediation organism. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 317-321, (2005), ISSN 0959-3993
Čejková A., Masák J., Fialová A., Siglová M., Jirků V. Biodegradation potential of Rhodococcus erythropolis towards aromatic compounds. Water Sci. & Technol. 52,151, (2005) ISSN 0273-1223
Chudoba J., Dohányos M a Wanner J. (1991) Biologické čištění odpadních vod. SNTL Praha
Jirků V., Masák J., Čejková A.: Carrier technology / humic additives to upgrade biological water treatment. In: Water Pollution, Modelling, Monitoring and Management, C.A. Brebia and J.S. Antunes do Carno, Eds. WIT Press, Southampton, Boston (2006) p. 509 ISBN 1-B4564-042-X
Kaprálík F. (1986) Fyziologie bakterií, SPN Praha
Lyons C.D., Katz S., Bartha R.: Mechanisms and Pathways of Aniline Elimination from Aquatic Environments. Applied and Environmental Microbiology. 48, 3, p 491-496, (1984)
Masák J., Čejková A., Siglová M., Kotrba D., Jirků V., Hron P.: Biofilm formation: A tool increasing biodegradation activity. Proc. Environmental Biotechnology 2002, Vol. III. Massey University Press, 2002, pp. 523-528.
Pitter P. (1999) Hydrochemie. Vydavatelství VŠCHT
Pitter P., Tuček F., Chudoba J. a Žáček L. (1983) Laboratorní metody v technologii vody., SNTL Praha

Vedoucí diplomové práce: Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.
Konzultant diplomové práce: Ústav nových technologií a aplikované informatiky
doc. Dr. Ing. Miroslav Černík, CSc.
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Datum zadání diplomové práce: 30. října 2008
Termín odevzdání diplomové práce: 29. května 2009


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 31. října 2008

Prohlášení

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé diplomové práce a prohlašuji, že s o u h l a s í m s případným užitím mé diplomové práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědom(a) toho, že užít své diplomové práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).

Diplomovou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum

Podpis

Poděkování

Především děkuji Ing. Tomáši Ledererovi, Ph. D., který mi byl po celou dobu mého těžkého úsilí na diplomové práci i mimo ni příkladným vedoucím a s jehož pomocí jsem mohla řádně tuto činnost dokončit. Velký dík patří mému konzultantovi Doc. Dr. Ing. Miroslavu Černíkovi, CSc., díky němuž mi bylo umožněno vykonat praxi na VŠCHT, která neocenitelným způsobem přispěla k rozšíření mých znalostí v oboru chemie a mikrobiologie. V souvislosti s tím patří můj velký dík týmu doktorandek na VŠCHT, jmenovitě Ing. Tereze Krulikovské a Ing. Olze Schreiberové, které mi během letní praxe na VŠCHT vždy poskytly vyčerpávající odpověď a pomoc. Především pak děkuji Ing. Jitce Hrdinové, která svou nekončící podporou nesmírně usnadnila veškeré autorovy invence. Z kolektivu TUL děkuji zejména Ing. Lence Lacinové a Ing. Bc. Štěpánce Klímkové, které vždy svým pragmatickým přístupem přispívaly ke správnému a rozumnému autorovu uvažování nad danou problematikou a do jediného děkuji zbývajícimu týmu TUL z laboratoře Centra ARTEC.

Anotace

Diplomová práce se zabývá aplikací technologie cíleně připravených mikroorganismů se schopností vytvářet přirozený biofilm pro čištění odpadních vod. Využívá se přirozené imobilizace speciálních biodegradérů xenobiotik ve formě biofilmu na povrchu pevného nosiče ve fluidním loži. Přirozená imobilizace zvyšuje rezistenci mikroorganismů (užití bakterií rodu *Rhodococcus*) k přítomnosti toxických látek a extrémních fyziologických podmínek. Laboratorní ověřování dané technologie probíhá na reálné odpadní vodě z výroby s obsahem anilinu DPG, CN- a dalších doprovodných organických látek a extrémně vysokou solností.

Prvořadým cílem práce je reprodukovat dané podmínky biologického čištění z plnoprovozní aplikace podniku Lučební závody Draslovka a.s. Kolín a užít jich v laboratorních experimentech. Za těchto podmínek ověřit základní technologické parametry a identifikovat limitní stavy technologie (minimální doba zdržení, maximální a minimální teplota, koncentrace kontaminantů, pH, ORP, potřebné živiny, salinita, rozpuštěný kyslík), a to při zachování efektivnosti celého procesu. K hodnocení účinnosti procesu se užívá CHSK, jako hledisko látkového zatížení (zejména koncentrace organických látek), dále pak optická densita a obrazová analýza biofilmu pro stanovení růstu a vývoje biomasy (jak dispergované, tak také imobilizované na nosiči). Další myšlenkou práce je stávající komerční technologii AnoxKaldnes optimalizovat, respektive vytvořit alternativní přístup za využití polymerních nanovlákných nosičů, které poskytují mnohé výrazné výhody, jakými je především jejich velký aktivní měrný povrch, vyšší resistance vůči vnějšímu toxickému působení, vysoká odolnost k fyzikálně-chemickým parametrům prostředí a zejména rychlost zpracování nosiče. Vývoj tohoto typu technologie představuje parciální a paralelní řešení jak mikrobiologické a materiálové stránky problematiky, tak chemicko-bioinženýrské řešení, proto vývoj tohoto typu nosiče probíhá ve spolupráci Technické univerzity v Liberci – fakulty mechatroniky, fakulty textilní, Vysoké školy chemicko-technologické v Praze – Ústav kvasné chemie a bioinženýrství a firmy AQUATEST.

Klíčová slova: biodegradace, imobilizace mikroorganismů, nosiče biomasy, nanovlákná technologie, průmyslové odpadní vody

Annotation

This diploma work is concerned with a new modular technology for wastewater treatment applying tailor-made microorganisms with ability to create natural biofilm. The technology utilizes the natural immobilization of special xenobiotics biodegraders in the form of a natural biofilm on the carrier in the fluid bed. Natural immobilization increases the resistance of microorganisms to toxic compounds and extreme physiological conditions. The evaluation of this technology was performed in laboratory research with real wastewater containing aniline, DPG, cyanides, accompanying organic compounds and extremely high salinity.

The first aim of this work is to simulate the existing conditions of biological treatment from fully operational application in the company “Lučební závody Draslovka a.s. Kolín” and use them in laboratory experiments. To verify the basic technological characteristics and identify the limits of the given technology (minimal residence time, maximum and minimum temperature, concentration of contaminants, pH, oxidation reduction potential, required nutrients, salinity, dissolved oxygen), whilst maintaining the effectiveness of the process. For an evaluation of the effectiveness of the process we used COD (chemical oxygen demand) in terms of the amount of substance (especially concentration of organic materials), optical density and image analysis of biofilm for the determination of the growth and development of the biomass (dispersed and immobilized on the carrier). The further objective of this work is to optimize the existing commercial technology AnoxKaldnes, to create an alternative approach to the use of polymeric nano-fibrous carriers which offer many benefits above all their large active specific surface, higher resistance of a created biofilm against external toxic incidence, high tolerance to physico-chemical parameters environment and the rate of the carrier colonization (AnoxKaldnes and nano-fibrous carrier). The development of a modern and original technology (nano-fibrous carrier) represents a partial and parallel solution for microbiology and material engineering, and also bio-engineering. Therefore the development of this type of carrier is underway in co-operation with the Technical University of Liberec– Faculty of Mechatronics, Informatics and Interdisciplinary Studies; Faculty of textile engineering; The Institute of Chemical Technology Prague (ICT, VŠCHT in Czech) - Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering and the company AQUATEST.

Keywords: biodegradation, immobilization microorganisms, carrier of biomass, nano-fibrous technology, industrial wastewaters

Tato stránka je prázdná

Úvod.....	14
-----------	----

TEORETICKÁ ČÁST

1 Nanotechnologie.....	16
1.1 Využití nanotechnologie k transformaci cizorodých látek.....	17
1.2 Rizika nanotechnologií	18
2 Biotechnologie	19
2.1 Dělení biotechnologií.....	20
2.2 Ne/výhody biokatalytických procesů	20
3 Nanobiotechnologie	22
3.1 Biotechnologie → nanotechnologie.....	23
3.2 Nanotechnologie → biotechnologie	23
4 Biodegradace cizorodých látek.....	24
4.1 Základní principy biodegradačních metod	24
4.2 Typy environmentálních biotechnologií	25
4.2.1 <i>Technologie bioremediace in-situ</i>	25
4.2.1.1 Bioremediace saturevané zóny	25
4.2.1.2 Bioremediace nesaturevané zóny	26
4.2.1.3 Přirozené snižování obsahu kontaminantu	26
4.2.2 <i>Technologie ex-situ a on-site</i>	26
4.2.2.1 Bioremediace na degradační ploše	26
4.2.3 <i>Biologické čištění odpadních vod</i>	27
4.2.3.1 Aktivace	27
4.2.3.2 Skrápěné biologické kolony (biofiltry).....	27
4.2.3.3 Rotační diskové reaktory	28
4.2.3.4 Bioreaktory	28
4.3 Charakteristika základních podmínek biodegradačních procesů.....	29
4.3.1 <i>Analýza místních podmínek</i>	29
4.3.2 <i>Potřeby a limitující faktory</i>	30
4.3.3 <i>Optimalizace podmínek</i>	30
4.3.4 <i>Předpověď degradační rychlosti</i>	30
4.4 Výběr vhodného mikroorganismu	31
4.4.1 <i>Rhodococcus</i>	31
5 Nosič biomasy.....	33
5.1 Přínos fixace mikroorganismů v biofilmu	33
5.2 Princip technologie využívající nosiče biomasy	33
5.3 Hlavní požadavky na nosič biomasy	34
5.3.1 <i>Výhody polymerních nosičů</i>	34
5.3.1.1 Obecné vlastnosti polyethylenu (PE).....	34
5.3.1.2 Obecné vlastnosti polypropylenu (PP)	35
5.3.1.3 Obecné vlastnosti polyuretanu (PUR)	35
5.3.1.4 Souhrnné vlastnosti PP, PE, PU.....	36
5.4 Polyethylenové nosiče biomasy („KR“)	36
5.4.1 <i>Anoxkaldnes™ MBBR</i>	37

5.5	Vláknenné polypropylenové, polyuretanové nosiče („BA“)	38
5.5.1	<i>Charakteristické rysy nanovláknenných polymerů</i>	38
5.5.2	<i>Výroba nanovláknenných polymerů</i>	39
5.5.3	<i>Příprava nanovláknenných nosičů před jejich použitím</i>	40
6	Průmyslové odpadní vody	41
6.1	Látky obsažené v průmyslových vodách	41
6.1.1	<i>Látky organické</i>	41
6.1.2	<i>Látky anorganické</i>	42
6.2	Způsoby čištění průmyslových odpadních vod	42
7	Ověření technologie AnoxKaldnes v praxi	43
7.1	Základní popis CHBČOV Lučební závody Draslovka Kolín	43
7.2	Hlavní kontaminace	47
7.2.1	<i>Kyanidy</i>	47
7.2.2	<i>Anilin</i>	47
7.2.3	<i>DPG</i>	48

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8	Degradace cizorodých látek v reálné odpadní vodě	50
8.1	Hlavní myšlenka laboratorního ověřování	50
8.2	Skladba laboratorního modelu	51
8.3	Prvotní testy	53
8.4	Princip provozu modelů	54
8.5	Ideální proces adaptace mikroorganismů	54
8.6	Reálný průběh adaptace mikroorganismů	56
9	Průběh degradačních procesů (laboratorní zkoušky)	57
9.1	Doba zdržení	58
9.2	CHSK	60
9.3	Teplota	64
9.4	Rozpuštěný kyslík, respirace	67
9.4.1	<i>Respirační testy měřením úbytku O_2</i>	68
9.4.1.1	<i>Vyhodnocení respiračních testů ČOV Draslovka Kolín</i>	69
9.4.1.2	<i>Vyhodnocení experimentální respiračních testů (pro různé teploty)</i> ..	70
9.5	Živiny	72
9.6	Hodnocení bakteriálního růstu	74
9.6.1	<i>Optická densita</i>	74
9.6.2	<i>Sušina</i>	77
9.6.3	<i>Obrazové hodnocení biofilmu</i>	79
9.6.3.1	<i>Obrazová analýza kolonizace nosiče mikroorganismy</i>	79
9.7	pH	83
9.8	Konduktivita, vodivost	86
9.9	ORP	89
9.10	Další faktory biodegradace	91
9.10.1	<i>UV světlo</i>	91
9.10.2	<i>Antimikrobiální látky</i>	91
9.10.3	<i>Hydrostatický tlak</i>	91
9.10.4	<i>Osmotický tlak</i>	91

9.11	Sorpce.....	92
9.12	Proces těkání	93
9.13	Degradace nosičů	93
10	Diskuse výsledků.....	94
11	Závěr	99
12	Literatura	101

Seznam nejpoužívanějších symbolů, zkratek a termínů

OV	...	odpadní voda
ČOV	...	čistírna odpadních vod
CHBČOV	...	chemicko-biologická čistírna odpadních vod
CN _{celk}	...	kyanidy celkové
DPG	...	difenylguanidin (urychlovač vulkanizace)
MO	...	mikroorganismy
Biofilm	...	bakteriální populace imobilizovaná (vázaná) na nosič
PE	...	polyethylenový nosič
Anoxkaldnes	...	komerčně dostupný PE nosič biomasy
KR	...	označení pro komerčně dostupný PE nosič s imobilizovanou populací MO
BA	...	označení pro nově vyvíjenou technologii nanovláknenných nosičů s imobilizovanou populací MO
CHSK	...	chemická spotřeba kyslíku
OD	...	optická densita, bakteriální populace dispergované v médiu (další používané termíny jsou absorbance, turbidita)
pH	...	koncentrace vodíkových iontů
ORP	...	oxidačně-redukční potenciál

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Současné aplikace nanotechnologií a předpokládaný vývoj.....	17
Obrázek 2 - Interdisciplinární povaha biotechnologií; Podíl finančních prostředků vynakládaných v USA na výzkum a vývoj v biotechnologickém průmyslu	20
Obrázek 3 - Zobrazení podílu dekontaminačních procesů	21
Obrázek 4 - Sféra nanobiotechnologie (bionanotechnologie)	22
Obrázek 5 - Schéma biologického odstraňování organických látek mikroorganismy ...	24
Obrázek 6 - Makro fotografie <i>Rhodococcus</i> na Petriho misce	32
Obrázek 7 - <i>Rhodococcus</i> po Gramově barvení	32
Obrázek 8 - Struktura polyethylenu (PE)	35
Obrázek 9 - Struktura polypropylenu (PE)	35
Obrázek 10 - Struktura polyuretanu (PU)	35
Obrázek 11 - Detail biofilmu na nosiči Anoxkaldnes.....	36
Obrázek 12 - 450 ČOV ve 47 zemích světa využívá technologie AnoxKaldnes	37
Obrázek 13 - Technologie Anoxkaldnes (K1 průmyslový, K3 komunální).....	37
Obrázek 14 - Technologické řešení nanovláknenného nosiče („nanobambule“); Detail nanovláknenné vrstvy (SEM mikroskopie).....	38
Obrázek 15 - Detailnější pohled na nanovláknennou vrstvu na polymerním nosiči; Dva týdny kolonizovaný nanovláknenný nosič	39
Obrázek 16 - CHBČOV Lučební závody Draslovka Kolín, průběh odstraňování organického znečištění.....	44
Obrázek 17 - Průběh odstraňování CN _{celk} a anilinu na přítoku a odtoku CHBČOV	46
Obrázek 18 - Blokové schéma systému v laboratoři	52
Obrázek 19 - PE nosič AnoxKaldnes s/bez biofilmu, „Nanobambule“ s/bez biofilmu .	52
Obrázek 20 - Schéma bioreaktoru	55

Obrázek 21 - Ideální průběh kultivace směsi v bioreaktoru	55
Obrázek 22 - CHBČOV, průběh odstraňování organického znečištění	58
Obrázek 23 - Průběh CHSK surové vody, doby zdržení a látkového zatížení, pro reaktory KR, BA	59
Obrázek 24 - Průběh CHSK v bioreaktorech KR, BA	61
Obrázek 25 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty CHSK	62
Obrázek 26 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty látkového zatížení	62
Obrázek 27 - Možnost úplné biodegradace reálné odpadní vody	63
Obrázek 28 - Závislost maximální rychlosti růstu MO na teplotě	64
Obrázek 29 - Průběh teploty v bioreaktorech KR, BA	64
Obrázek 30 - Mikroskopické pozorování bakterií po teplotní sterilaci	65
Obrázek 31 - Makroskopické pozorování bakterií po teplotní sterilaci	66
Obrázek 32 - Korelace dat O ₂ , teplota pro KR, BA	66
Obrázek 33 - Průběh O ₂ v bioreaktorech KR, BA	68
Obrázek 34 - Průběh respiračního testu	70
Obrázek 35 - Znázornění průběhu respiračních rychlostí	70
Obrázek 36 - Příklad měření respirační rychlosti	71
Obrázek 37 - Graf podílu nutrientů a chloridů v surové vodě	73
Obrázek 38 - Průběh absorbance v bioreaktorech KR, BA	75
Obrázek 39 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty absorbance	77
Obrázek 40 - Růstová křivka	77
Obrázek 41 - Stanovení celkové sušiny v bioreaktorech KR, BA	78
Obrázek 42 - Nárůst biofilmu na solné podložní matrici	79
Obrázek 43 - Obrazové zachycení časového vývoje kolonizace nosičů	80
Obrázek 44 - Mikroskopické pozorování povrchu nosiče KR - původní a použité	81
Obrázek 45 - Mikroskopické pozorování povrchu nosiče BA - prvotní kolonizace	81
Obrázek 46 - Obrazová analýza nárůstu biofilmu	82
Obrázek 47 - <i>Rhodococcus</i> na plastovém nosiči, nanovlákněném nosiči	82
Obrázek 48 - Jasový profil nárůstu biofilmu, ve formě „3D“ obrazu	83
Obrázek 49 - Průběh pH v bioreaktorech KR, BA	85
Obrázek 50 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty pH	85
Obrázek 51 - Korelace dat pH, vodivost pro KR, BA	86
Obrázek 52 - Korelace dat vodivost, teplota pro KR, BA	87
Obrázek 53 - Průběh vodivost v bioreaktorech KR, BA	87
Obrázek 54 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty vodivosti	88
Obrázek 55 - Korelace dat pH, vodivost pro KR, BA	88
Obrázek 56 - Průběh ORP v bioreaktorech KR, BA	89
Obrázek 57 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty ORP	90
Obrázek 58 - Korelace dat ORP, kyslík pro KR, BA	90
Obrázek 59 - Průběh sorpce na daném typu nosiče	92
Obrázek 60 - Proces tékání kontaminantů z reálné odpadní vody	93
Obrázek 61 - Závislost účinnosti čištění OV na průtoku a teplotě pro KR, BA	94
Obrázek 62 - Průběh látkového zatížení na teplotě	95

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Výhody a nevýhody biotechnologie.....	21
Tabulka 2 - Rozdělení biochemických procesů dle akceptoru elektronů	24
Tabulka 3 - Rozdělení biofilmových reaktorů	27
Tabulka 4 - Technologie metod ex-situ	29
Tabulka 5 - Základní vlastnosti bakterie <i>Rhodococcus</i>	32
Tabulka 6 - Základní vlastnosti užitých polymerů	36
Tabulka 7 - Denní množství OV a koncentrace kontaminantů z jednotlivých zdrojů....	45
Tabulka 8 - Parametry nátoku na CHBČOV	45
Tabulka 9 - Předpokládaná kvalita odtoku z CHBČOV (po zapracování bio.stupně) ...	45
Tabulka 10 - Hodnoty stanovované ve směsných vzorcích na odtoku z BČOV	46
Tabulka 11 - Přehled základních vlastností hlavních polutantů OV na CHBČOV	49
Tabulka 12 - Porovnání technologie Draslovky a laboratorního reaktoru s toutéž technologí (kyanidy, anilin a jiné)	63
Tabulka 13 - Kyanidy, NL, porovnání stavu reaktoru Anoxkaldnes (KR) a nanovláknenného reaktoru (BA)	63
Tabulka 14 - Vliv teploty a doby zdržení na CHSK a OD	65
Tabulka 15 - Přehled zatížení CHBČOV Draslovka Kolín na přítoku	69
Tabulka 16 - Vyhodnocení respiračních testů ČOV Draslovka Kolín	69
Tabulka 17 - Stanovení sušiny pro různé teploty	71
Tabulka 18 - Vypočtené rychlosti pro různé teploty	71
Tabulka 19 - Obsah nutrientů v OV Draslovka	72
Tabulka 20 - Nutrienty v bioreaktoru KR, BA	72
Tabulka 21 - Obsah nerozpuštěných látek v bioreaktoru KR, BA	86

Ačkoli člověk tvoří mnoho objevů pomocí různých prostředků, nikdy nenavrhne nic krásnějšího, jednoduššího a přesnějšího než příroda, protože v jejích výtvorech nic nechybí a nic nepřebývá.

Leonardo Da Vinci

Úvod

Již odedávna, co je člověk člověkem, dochází ke znečišťování životního prostředí. Bohužel však v průběhu posledních několik desítek let je tento problém diskutován ve vyšší míře, než kdy předtím, a není divu. Společně s rostoucími nároky obyvatel se rozvíjí i technologie a s tím roste i zatížení životního prostředí. V poslední době jde především o chemické zatížení tzv. xenobiotiky, což jsou zcela nově syntetizované látky, se kterými se veškeré organismy žijící na zemi v průběhu evoluce nesetkaly. Nejzávažnějším problémem jsou látky toxické (pro člověka nebo mikroorganismy, jde především o látky vysoké koncentrace a dlouhé době působení), neboť ty velice komplikují možnou adaptaci mikroorganismy. Významnými přispěvateli jsou v podstatě všechny oblasti lidské činnosti: chemický průmysl, zemědělství (pesticidy, herbicidy), lékařství (syntetické léky, chemoterapeutika, psychotropní látky), potravinářství (aditiva, ochucovadla, barviva), energetický průmysl (CO_2 , SO_2 , popílek), doprava (NO_x , olovo, CO_2), spotřební průmysl (plasty, barviva, nátěrové hmoty), samozřejmě nesmíme zapomenout na případy odstraňování starých ekologických zátěží.

Metody odstraňování takovýchto ekologických zátěží mohou být v zásadě trojího typu: fyzikální, chemické a biologické. Fyzikální či chemické metody odstraňování polutantů vedou často k tvorbě dalších toxických látek (meziproduktů), čímž je problém řešen pouze částečně. Biologické postupy využívají schopnosti adaptace a široké metabolické aktivity mikroorganismů (převážně bakterií), hub i rostlin, jsou navíc výhodné i ekonomicky. Využití mikroorganismů schopných vytvářet přirozený biofilm (MO kolonizující pevné povrchy) navíc nabízí nespornou výhodu, kterou je jejich obecně vyšší rezistence k toxikantům a možnost udržení i pomalu rostoucích mikroorganismů v systému.

Standardní metody odstraňování xenobiotik za účasti biofilm tvořících mikroorganismů probíhají při čištění odpadních vod. Nejvíce diskutovaným tématem dnešních dní je extrémní zatížení průmyslových odpadních vod. Této problematice se věnuje velké množství renomovaných firem po celém světě, které se snaží optimalizovat zejména technologii procesu. Nejvýraznějším přispěvatelem k účinnosti celého procesu je zejména nosič biomasy, který ze své podstaty nabízí rozsáhlé možnosti technologických inovací (chemické složení, tvar, povrchová úprava, pevnost, smáčivost, možnosti sorpce, degradace aj.). V této práci je pozornost zaměřena na komerčně dostupný produkt AnoxKaldnes™ MBBR, který je v současné době využíván například na kombinované chemicko-biologické čistírně odpadních vod Lučební závody Draslovka a.s. Kolín. Pro tuto technologii je snahou identifikovat limitní stavy daných parametrů (teplota, doba zdržení aj.) a pokud možno navrhnout optimalizaci celé technologie.

V poslední době jsou velice diskutovány nanotechnologie, které doposavad skrývaly značný potenciál. Tomuto oboru se věnuje i Technická univerzita v Liberci (TUL). Na základě předem daných parametrů byl na TUL zahájen vývoj nového typu nosiče, který je založen na využití nanovláknenných materiálů jako nosiče biomasy (polymer, např. PE, PU, PP). Formou aplikace je částice, optimálně sférického tvaru,

kteřá je tvořena nosnou nití s nánosem nanotextile. Jednoznačnou výhodou je vysoký specifický chráněný povrch nanovláken, což může ovlivňovat zejména úvodní fáze kolonizace povrchu nosiče. Vývoj tohoto typu technologie představuje parciální a paralelní řešení jak mikrobiologické a materiálové stránky problematiky, tak chemicko-bioinženýrské řešení, tedy identifikace a ověření provozně možných technologických parametrů. Technologie přípravy nosiče je řešena na TUL – fakulta textilní (FT) a fakulta mechatroniky (FM), testování jeho vhodnosti z hlediska kolonizovatelnosti různými mikroorganismy na TUL – FM a Ústav kvasné chemie a bioinženýrství Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (ÚKCHB – VŠCHT) a chemickobio-inženýrská oblast včetně modelového ověření pak ve spolupráci TUL a firmy AQUATEST.

Celý výše popsany proces je dále podrobněji rozebrán, jak po stránce teoretické, tak i jeho praktické ověření v laboratorních podmínkách. Pozornost je v oblasti řešerše zaměřena zejména na nanotechnologie a biotechnologie a jejich propojení do tzv. bionanotechnologie, zevrubný popis zahrnuje biodegradaci cizorodých látek a s tím související identifikace vhodného mikroorganismu. Podrobně jsou charakterizovány jednotlivé typy nosičů, a to jak komerční technologie AnoxKaldnes, s nimiž je srovnávána zcela původní technologie za využití nanovláknenných nosičů. Oba typy jsou dále porovnávány v experimentální části. Následuje popis reálných průmyslových odpadních vod a charakteristika příkladové studie chemicko-biologické čistírny Lučební závody Draslovka a.s. Kolín, jejíž čistitelnost je v experimentální části práce laboratorně ověřována (schopnost biodegradability bakteriální populace na daném typu nosiče). Modelovány jsou například případné nežádoucí vlivy a mezní limity obou technologií (doba zdržení, teplota, rozpuštěný kyslík, CHSK, živiny, vodivost, pH, ORP, optická densita), případně další možné vlivy (například sorpce). V práci je zahrnuta také oblast obrazové analýzy a mikroskopického vyhodnocování bakteriálního biofilmu.

Tato práce probíhala na FM – TUL, Ústavu nových technologií a aplikované informatiky. Tento obor je multidisciplionární a nemá přímou specializaci na chemii, proto je text práce koncipován pro nechemické obory. Jelikož se jedná o zcela původní a pokrokovou technologii (kombinace nano- a bio- technologie) je zde výjimečně obsáhleji popsána teoretická část.

TEORETICKÁ ČÁST

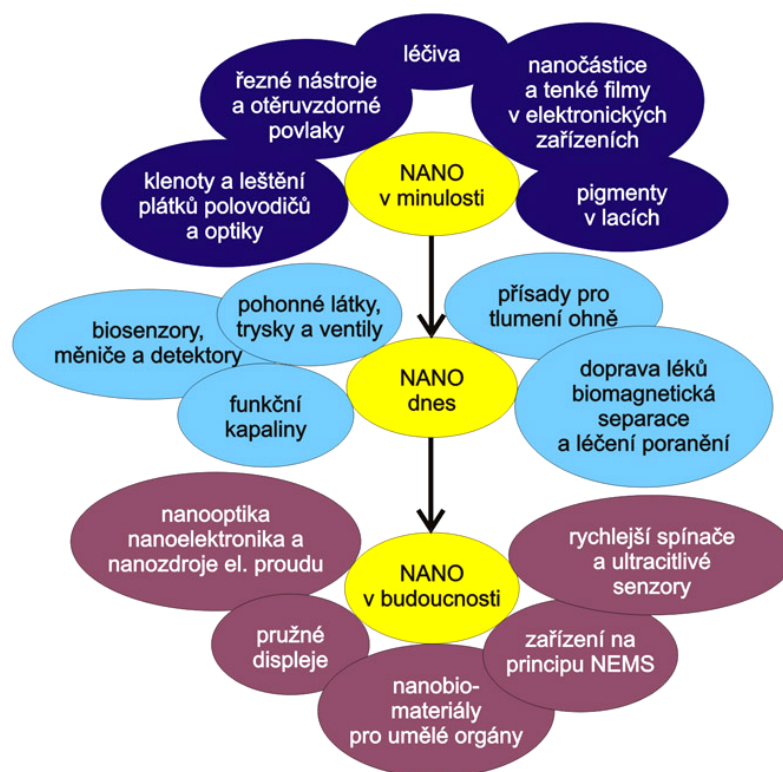
1 Nanotechnologie

Nanotechnologie je skupina intenzivně se rozvíjejících se mezivědních oborů (např. elektronika, doprava, zdravotnictví, energetika, životní prostředí aj. [1]), které využívají pokroku v technologii k poznání a řízení struktury materiálů v rozměrech, jež se blíží velikosti až k jednotlivým molekulám. Jedná se o vědní oblast na průsečíku fyziky, chemie, inženýrství a molekulární biologie. Nanotechnologie využívají získané vědomosti k vytváření nových materiálů a struktur s novými a mnohdy nevšedními vlastnostmi.

Oblast nanosvětla se zabývá použitím částic a struktur o rozměrech v mezích od cca 1 nm do 100 nm (od 10^{-9} do 10^{-7} m), které nebyly v minulosti středem přílišné pozornosti. Nanostruktury, které jsou základními prvky nanomateriálů, jsou dostatečně malé na to, aby se v nich mohly uplatňovat kvantové jevy. Jsou však i tak rozměrné, že aplikace zákonů kvantové mechaniky při zkoumání jejich vlastností nemá význam [2]. Pojem však neznamená pouhé použití materiálů, které jsou zmenšeninou materiálů existujících v mili- či mikro- rozměrech, ale hlavní podstatou je, že tyto materiály a struktury dostávají díky svým rozměrům či uspořádání nové vlastnosti dané výraznou změnou fyzikálních, chemických nebo biologických vlastností. Toto vyplývá z faktu, že rozměry těchto částic jsou tak malé, že dokáží ovlivňovat, řídit či reagovat s okolním prostředím na úrovni jednotlivých atomů a molekul. [3]

Nanotechnologie jsou interdisciplinární a průřezové technologie rozvíjející se v řadě oblastí, např.: [2]

- Oblast nanomateriálů je zaměřena na zkoumání a vývoj nových druhů materiálových **systémů**, jejichž podstatné vlastnosti vyplývají z rozměrů jejich složek v nanometrech.
- **Nanochemie** se zabývá vytvářením a modifikací chemických systémů, jejichž funkčnost pramení z jejich nanorozměrů. Supramolekulární funkční systémy představují materiálový základ nových látek.
- **Nanovýroba** zkoumá a vyvíjí metody technologie výroby struktur, vrstev a systémů v nanorozměrech.
- **Nanoanalytika** rozvíjí analytické metody a nástroje pro zkoumání a pochopení základních jevů a pro charakterizování výrobků. Objev skenovacího tunelovacího mikroskopu (STM) a mikroskopu atomových sil (AFM) v osmdesátých letech minulého století odstartoval rozvoj nanovědy a nanotechnologií.
- **Nanobiotechnologie (bionanotechnologie)** se zabývá využitím biologických nanosystémů v technických systémech, od senzorové technologie po fotovoltaika. Používají též nanotechnologické postupy při zkoumání biologických systémů, z čehož budou mít velký prospěch zejména oblasti lékařské techniky a molekulární diagnostiky.



Obrázek 1 - Současné aplikace nanotechnologií a předpokládaný vývoj [2]

1.1 Využití nanotechnologie k transformaci cizorodých látek

Příkladem může být použití **elementárního nanoželeza** (Fe^0), které má podobné chemické reduktivní účinky jako makroskopické železo, ale nanoFe díky velikosti částic se dokáže transportovat podzemní vodou od místa injekece až ke kontaminované oblasti, kde dochází k chemické degradaci kontaminantů. Ovšem nejvýznamnější je díky svému styčnému povrchu, který jej při transformaci cizorodých látek činí několikanásobně aktivnějším. Tímto tématem, využití nanotechnologie při sanaci kontaminovaného území, se zabývá několik institucí v České republice. Jedno z předních míst v tomto směru zaujímá i TUL, která se věnuje využití elementárního nanoželeza k dekontaminaci podzemních vod, jeho transportu podloží, laboratorním i pilotním testům, povrchovým úpravám (nutná biodegradabilita povrchových vrstev). Široká škála uplatnění této technologie se vztahuje také k čištění odpadních vod (například OV z chemického, textilního a papírenského průmyslu).

Pozitivně nabití ionty stříbra jsou pro mikroorganismy vysoce toxické. Antibakteriální účinek **nanočástic stříbra** znali dokonce staří Římané. Účinky stříbra nejsou selektivní, což má za následek, že stříbro projevuje antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru lékařsky zajímavých mikroorganismů včetně bakterií, hub a kvasinek. Hlavní účinek souvisí s velkou aktivní plochou povrchu nanočástic, které mají rozměr 5 - 15 nm. Kovové stříbro je biologicky inertní a prochází skrze tělo, proto se častěji používá oxid stříbrný (Ag_2O). Nanočástice stříbra se používají například do fasád domů proti řasám i do vnitřních omítek proti plísním (v nemocnicích). [2]

Příprava vrstev na bázi **nanokrystalického oxidu titaničitého** probíhá také ve spolupráci s TUL, fakultou strojní. Využívá se fotokatalytického TiO_2 , jehož velkým přínosem je fotokatalytická aktivita umožňující působením ultrafialového záření ($\lambda <$

390 nm) degradovat veškeré organické struktury, včetně mikroorganismů. Díky tomuto materiálu mají vrstvy na světle samočisticí schopnosti a desinfekční účinky. Na površích pokrytým takovouto vrstvou dochází k oxidativní mineralizaci usazených organických sloučenin a mikroorganismů. [4]

Dalším využitím nanotechnologie k transformaci škodlivých látek může být využití **nanotextilí** (využití nanovláknenných materiálů jako nosiče biomasy, uplatnění má samozřejmě i v mnoha dalších směrech, především lékařství). I této problematice se věnuje TUL, kde na fakultě textilní probíhá vývoj a výzkum nanovlákn. Fakulta mechatroniky se dále věnuje využití tohoto materiálu k čištění povrchových a průmyslových vod, a to za přítomnosti bakteriální populace na nanovlákně. Jednoznačnou výhodou je vysoký specifický chráněný povrch nanovláken, které mohou ovlivňovat zejména úvodní fáze kolonizace povrchu nosiče bakteriemi.

1.2 Rizika nanotechnologií

Nové výzkumy ukazují, že i tyto úžasné materiály spolu nesou i neopomenutelná rizika. Už více než desetiletí experti upozorňují na stinné stránky například nanotrubíček (zejména nebezpečí toxických zplodin vznikajících při výrobě) [5]. Velice pravděpodobné jsou také karcinogenní účinky, neboť nanočástice mohou (díky své malé velikosti) pronikat do tělesných buněk a překonávat biologické bariéry [1] .

Přesto se zdá, že riziko je zvládnutelné, jelikož nanočástice mají ve volné přírodě tendence agregovat, rychle se nabalují do větších shluků, s nimiž se tělo bez problémů vypořádá. Mnoho druhů nanočástic nejsou zdraví škodlivé, používají se proto v opalovacích krémech jako ochranný faktor nebo se přidávají ve vázané formě k jiným materiálům, takže spotřebitel se s jednotlivými nanočásticemi vůbec do styku nedostane. [1]

Prozatím převládal názor, že nebezpečí je spíše teoretické. V každém případě platí, že největším rizikům jsou vystaveni lidé, kteří se podílí na výrobě nanomateriálů. Samotné používání výrobků tak problematické není. Komplikace se objevují až na konci životnosti, likvidace těchto materiálů bude vyžadovat zvláštní opatrnost a speciální postupy. [5]

2 Biotechnologie

Termín „biotechnologie“ byl zaveden v roce 1919 maďarským inženýrem Karlem Erekyem pro sumarizaci všech metod používajících mikroorganismy pro přeměnu surovin v produkty (proces nazývaný fermentace). Skutečným začátkem klasické biotechnologie byl až Pasteurův objev, že za fermentační procesy jsou odpovědné mikroorganismy [6]. Server www.inovace.cz definuje pojem biotechnologie, takto: „**Biotechnologie je aplikace vědy a technologie na živé organismy nebo jejich části, výrobky a modely pro přeměnu živých i neživých materiálů za účelem vytváření znalostí, zboží a služeb.**“ Další definicí může být například: „**Biotechnologie znamená integrované využití biochemie, mikrobiologie a inženýrských věd umožňující průmyslové aplikace za pomoci mikroorganismů, tkáňových kultur a jejich částí** [7].“ Nejvýstižnější definicí by však mohla být ta, jež byla formulována Evropskou biotechnologickou federací (EFB): „**Biotechnologie je jakákoliv technologie, která využívá biologické systémy, živé organismy nebo jejich části k výrobě nebo modifikaci produktů, ke šlechtění rostlin a živočichů nebo mikroorganismů pro specifická použití**“ [2]. Nejčastější otázky k oboru biotechnologie a její uplatnění ve výrobě atd. lze nalézt v literaturách [8], [2]. Jelikož se téměř v každém městě na celém světě nachází malá či větší čistírna odpadních vod, dalo by se říci, že čištění odpadních vod je největší biotechnologie na světě [9].

Biotechnologie užívá živých organismů, buněk nebo jejich částí (enzymů) k výzkumu, jehož poznatky pak dávají vzniknout novým produktům a aplikacím v **medicině** (výroba insulínu a hormonů), **zemědělství** (odrůdy kukuřice a bavlny odolné k hmyzu, sója odolná k herbicidům), **potravinářství** (například pro výrobu vína, piva, sýrů), v **ropném průmyslu** (biopaliva), v **chemickém průmyslu** či jiných průmyslových procesech. Biotechnologie se uplatňuje při **úpravě odpadů a organických materiálů** (kompostování, mechanicko biologická úprava). Také se používá k **remediaci** znečištěné zeminy (bioremediace). Intenzivně se rozvíjejícím odvětvím biotechnologie jsou **genetické manipulace** organismů (do jednoho organismu se cíleně vnáší určitý gen či geny jiného organismu), s cílem optimalizovat procesy. [6], [10]

Molekulární biotechnologie patří v současné době k nejvíce se rozvíjejícím odvětvím a má významný přínos pro bezpečnost a kvalitu života, jakož i udržitelný rozvoj [2]. V současnosti je biotechnologie interdisciplinární vědou, která je ovlivňována chemií, biologií, fyzikou, materiálovými naukami, inženýrstvím a také informatikou, což dokumentuje *Obrázek 2*. „V blízké budoucnosti lze dokonce očekávat první výsledky vzájemného prolínání biotechnologií s nanotechnologiemi.“ [6], [10]

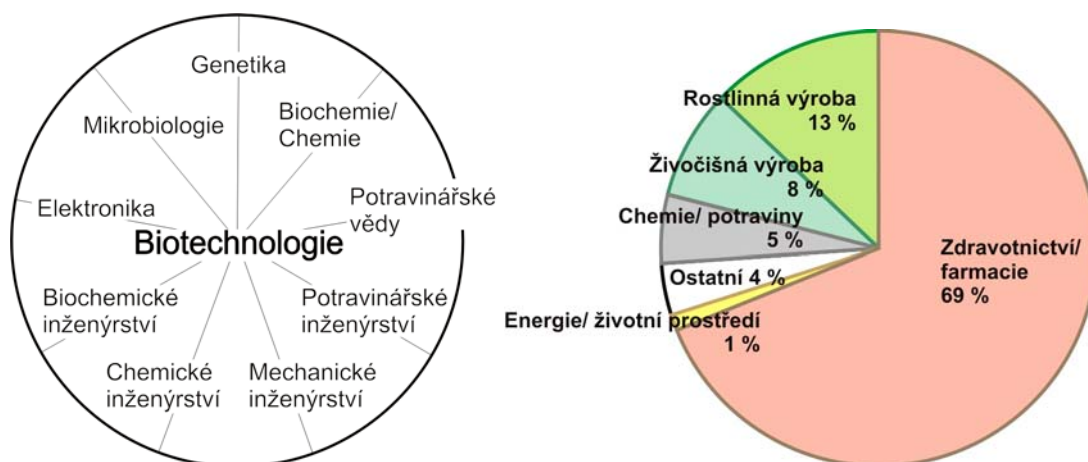
Velice příhodný je nový dokument Evropské komise „Nanotechnologie, Inovace pro zítřejší svět“, který je ke stažení na webových stránkách:

ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanotechnology_bat_cs.pdf

A také odkaz <http://www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie200610.pdf>,

který se věnuje moderní problematice bionanotechnologie a nanobiotechnologie.

Současná biotechnologie je asi nejvíce diverzifikovaný obor ze všech přírodních věd s největší dynamikou rozvoje. Historie a vývoj tohoto oboru viz. dokumentace [7]. Nově získané biologické znalosti významně ovlivňují více jak 30 % globálního ekonomického obratu prostřednictvím péče o lidské zdraví, produkce potravin, energie, zemědělství a lesnictví [7]. Biotechnologie se tak stávají rozhodujícími technologiemi pro 21. století.



Obrázek 2 - Interdisciplinární povaha biotechnologií; Podíl finančních prostředků vynakládaných v USA na výzkum a vývoj v biotechnologickém průmyslu [7]

2.1 Dělení biotechnologií

Biotechnologické disciplíny lze klasifikovat podle různých kategorií. Poměrně běžná je klasifikace na základě oblasti, ve které je použit výsledný biotechnologický produkt. Rozlišuje se tak:

Červená biotechnologie

Biotechnologie využívaná v lékařství a farmacii. Příkladem mohou být bakterie produkující antibiotika nebo lidský insulin (první humánní protein vyráběný mikroorganismy, výroba syntetických vakcín proti malárii, vzteklině a hepatitidě B). [11]

Zelená biotechnologie

Biotechnologie používaná v zemědělství. Příkladem mohou být bakteriální kmeny používané ke kompostování nebo transgenní plodiny. Geneticky upravené plodiny (sója, bavlna, kukuřice, dýně, brambory, řepka, tabák, papája a karafiáty), které jsou odolné vůči herbicidům či hmyzu. V současnosti se již vyvíjejí plodiny, které lépe snášejí sucho či záplavy, půdu s vyšším obsahem solí či kovů, horko či zimu. [6], [11]

Bílá biotechnologie

Také nazývaná jako šedá biotechnologie, je vznikající odvětví v rámci moderní biotechnologie, která je aplikovaná při průmyslové výrobě chemických látek. Výhodou použití živých organismů (buňky, plísně, kvasinky nebo bakterie, používány přímo nebo geneticky upravené) nebo enzymů v průmyslové výrobě je většinou výhodnější ekonomie výroby, jsou často efektivnější a mají nižší ekologický dopad než tradičně používané chemické procesy. [11], [12]

2.2 Nevýhody biokatalytických procesů

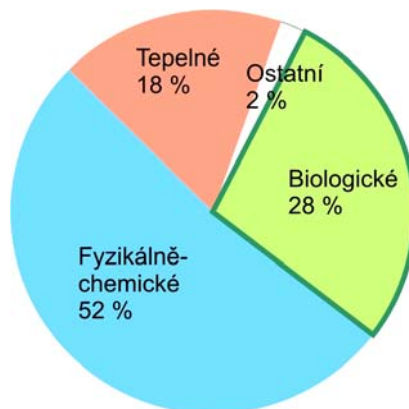
Biokatalytické procesy využívají schopnosti živých organismů nebo jejich biologických částí k přeměně látek. Biokatalýza umožňuje syntézu látek v jediném biologickém kroku za nižší teploty (obvykle 25 – 37°C), při nižších tlacích a v podmínkách, které šetří energii, vodu, suroviny a životní prostředí (účinnost MO může být zvýšena genetickým inženýrstvím). Zatímco pro chemickou syntézu stejných látek je často zapotřebí mnoha výrobních kroků včetně užívání (toxických) rozpouštědel

a vysokých teplot. Biologické reakce jsou jednodušší, méně nebezpečné, ekonomicky efektivnější a udržitelnější vzhledem k životnímu prostředí. Nahrazování, chemických procesů procesy biokatalytickými, je však pro vyšší nákladnost pomalejší. Svou roli hraje i dlouhá tradice chemického průmyslu a často vysoké nutné investice pro přeměnu stávajících průmyslových procesů. [12]

Rizika lze jednoduše dokumentovat pro užití moderních biotechnologií (a zvláště genetického inženýrství) v zemědělství, při výrobě krmiv a potravin, což by mohlo představovat krátkodobá i dlouhodobá rizika pro prostředí. Některá rizika by mohla být považována za nevratná a tak by nemusela být některými lidmi přijímána. Dalším možným pohledem se zdají být také některé sociální a ekonomické dopady, které se v poslední době nacházejí ve vzrůstající fázi zájmu. Údaje o možných následcích, zda-li tedy existují (například geneticky modifikovaných plodin na své okolí a na prostředí), se shromažďují.

Tabulka 1 - Výhody a nevýhody biotechnologie [7]

Výhody	Nevýhody
<ul style="list-style-type: none"> - komplexní molekuly (proteiny) nelze produkovat chemicky - biokonverze poskytuje vyšší výtěžky - děje probíhají za „normálních“ podmínek (teplota, tlak, pH) - vysoká specifika katalytických reakcí - exkluzivní produkce jediného izomeru dané látky 	<ul style="list-style-type: none"> - snadná kontaminace zařízení „cizím“ (mikro)organismem - produkt obsažen v komplexí směsi vyžadující složitou separaci a purifikaci - poměrně vysoká spotřeba vody - bioprocessy jsou obvykle pomalejší ve srovnání s chemickým procesem

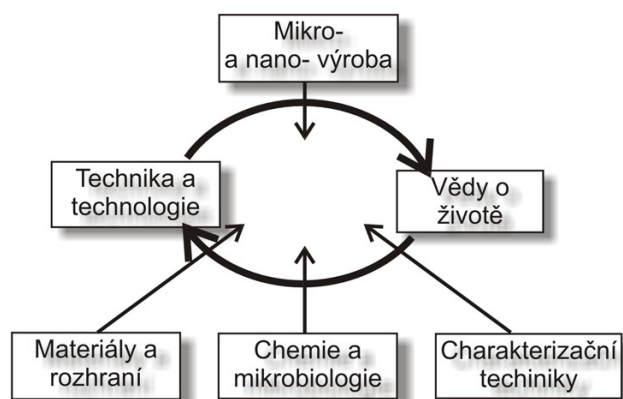


Obrázek 3 - Zobrazení podílu dekontaminačních procesů [7]

3 Nanobiotechnologie

Jednou z nejvýznamnějších interdisciplinárních sfér, která se začíná v poslední době nanejvýš uplatňovat, je rozhraní mezi biologickými vědami a nanotechnologií. Sbližování biologických věd a nanotechnologií je doménou nanobiotechnologie, resp. bionanotechnologie. **Nanobiotechnologie** je definována jako oblast, která používá principů a technik nanotechnologie k porozumění biosystému (živému či neživému) a pro jeho případnou transformaci. **Bionanotechnologie** využívá poznatků ze zkoumání živé přírody, principy z oblasti biologie a biomateriálů k vytváření nových technologií a systémů například i v nanorozměrech [2]. „V příštím desetiletí se očekává, že dojde ke zrychlení integrace nanotechnologií s biotechnologiemi a rovněž i s informačními technologiemi.“ [13]

Představa nanobiotechnologie (bionanotechnologie) je znázorněna na *Obrázek 4*. Do základního kruhu vzájemně se ovlivňujících věd o živé přírodě, inženýrství a technologie vstupují vědní a technologické oblasti jako mikro- a nano- výroba, materiály, chemie a mikrobiologie, charakterizační techniky a mnoho dalšího. [2]



Obrázek 4 - Sféra nanobiotechnologie (bionanotechnologie) [2]

Aplikace výsledků výzkumu z oblasti nanobiotechnologie (bionanotechnologie) přinese významný pokrok v mnoha důležitých oborech, např.:

- **Aplikace v medicíně** zahrnují např. miniaturizované diagnostické metody, používané ke včasnému rozpoznání chorob a stavu organismu. Nanotechnologické povrchy mohou zlepšit bioaktivitu a biokompatibilitu implantátů, poskytují tak dlouhodobou perspektivu pro syntetické transplantace orgánů. Vyvíjejí se zcela nové systémy pro podávání léků, nedávno se podařilo transportovat nanočástice do buněk tumoru s cílem jeho likvidace ohřevem. [2]
- **Výzkum potravin, vody a životního prostředí** se rozvíjí využitím bionanotechnologie zejména při zjišťování a neutralizaci přítomnosti mikroorganismů nebo pesticidů. Původ potravin by mohl být sledován pomocí nového způsobu miniaturizovaného „značkování“. Vývoj nanotechnologických (např. fotokatalytických) technologií pro odstraňování škodlivin by mohl významně pomoci při odstraňování škod v životním prostředí (např. znečištění vod nebo půdy ropnými produkty). [2]

3.1 *Biotechnologie* → *nanotechnologie*

Biologické a fyzikální vědy sdílejí společný zájem o malé struktury. Výměna informací přes hranice obou vědních oblastí se projevila v oblasti nových materiálů a vědeckých nástrojů zkoumání (převážně v oblasti fyzikálních věd) a ve studiu nových jevů (převážně v oblasti biologických věd). Nanotechnologie nabízí biologii nové nástroje zkoumání a biologie nabízí nanotechnologii přístup k novým druhům funkčních nanosystémů (komponentám buněk), které jsou extrémně zajímavé a zřejmě i užitečné. Je třeba poznamenat, že příspěvek biologii není jen „nano“, ale zahrnuje struktury mající široký rozsah rozměrů. Rozsah rozměrů zahrnující „nano“, „mikro“ či zjednodušeně „malé“ struktury je důležitý, protože struktury nezbytné pro život buněk mají velikosti od malých molekul k strukturám o velikosti milimetrů. Biologické struktury jsou svým hierarchickým uspořádáním vzorem pro propojování umělých nanostruktur do rozměrnějších celků. Znalost struktury buněk a procesů v nich probíhajících jsou pro rozvoj nanotechnologií významné. Buňka je podstatou biologie. Je to nejmenší jednotka, která je živá. Buňka je v podstatě prostor, v němž probíhá soustava chemických reakcí. Tyto reakce (katalyzované) se navzájem ovlivňují a spolu vytvářejí struktury s význačnými vlastnostmi jako jsou schopnost replikace, adaptace, zásobování energiemi atd., čemuž říkáme „život“. Porozumění biologickým procesům na úrovni nanometru je silná hnací síla pro rozvoj nanotechnologií. [2]

3.2 *Nanotechnologie* → *biotechnologie*

Pro aplikaci nanotechnologií v biotechnologiích se v poslední době používá výrazu zejména nanobiotechnologie. Nanobiotechnologie se zabývá využitím nanomateriálů, zobrazovacích nanotechnologických metod a nanozařízení při zkoumání biologických systémů, v diagnostice, při vývoji nových léků a v dalších oblastech. [2]

Nanotechnologie nabízejí nová řešení pro transformaci biosystémů a poskytují širokou technologickou základnu pro využití v několika oblastech. Uvedu jen několik příkladů: [2]

- v průmyslovém **biozpracování**;
- molekulární medicíně - **nanomedicíně** (odhalování a léčba chorob, nahrazování částí lidského těla, regenerativní medicína, nanometrická chirurgie, syntéza a cílená dodávka léků do organismu atp.);
- při zkoumání vlivu **nanostruktur** na zdraví a životní prostředí (vliv znečištění okolí nanočásticemi a ekotoxikologie);
- v budoucnosti při **zlepšování kvality** lidského výkonu (zvyšování smyslové kapacity, propojení mozku a mysli, integrování nervových systémů s nanoelektronikou a nanostrukturovanými materiály).

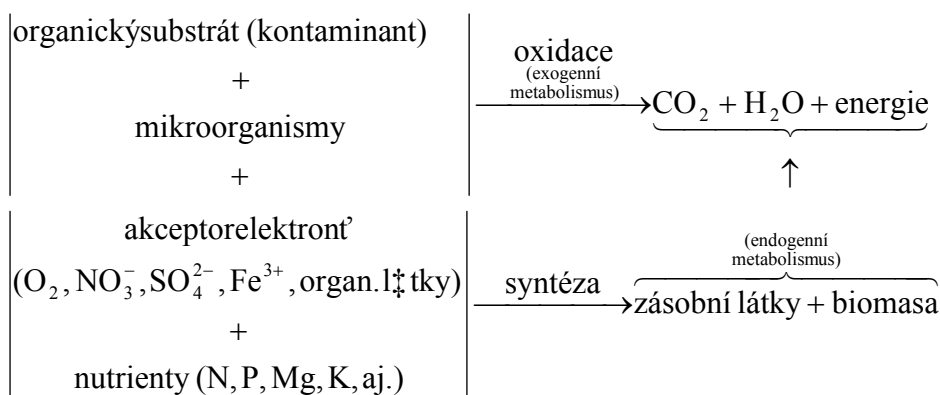
Nanotechnologie nabízejí pro biotechnologie, medicínu a další oblasti nové nástroje a přístroje zkoumání na molekulární úrovni, nové analytické postupy a především nové materiály zvláštních vlastností. [2]

4 Biodegradace cizorodých látek

4.1 Základní principy biodegradačních metod

Biodegradace (biologicky katalyzované **snížení** komplexity chemických sloučenin) využívá **mikrobiálního** společenstva například bakterií k odstranění či transformaci širokého spektra kontaminantů a materiálů z půdy, povrchových, podzemních či odpadních vod [14]. Cílem je transformovat přirozené odpadní organické látky i xenobiotika na jednodušší sloučeniny, v ideálním případě probíhá **degradace až na CO₂ a vodu** [15] (častěji na minerální látky). Základem technologie je stimulace mikroorganismů, což obnáší poskytnout zejména správnou **kombinaci**: akceptor elektronů, živiny, teplota, pH, ORP, doba zdržení, limitovat obsah solí, v důsledku čehož jsou MO schopny růstu a mohou k tomu využívat kontaminantu jako zdroje potravy a energie. Stejně jako jiné technologie, tak i biodegradace je limitována druhem kontaminace (např. fyzikálně-chemická charakteristika). Podle míry strukturních změn rozkládané sloučeniny mohou být biodegradační procesy rozlišeny následujícím způsobem. [14]

Transformace, kdy MO mění primární strukturu molekuly substrátu. Může dojít k tvorbě dále již nerozložitelného metabolitu. Biotransformační pochody vedou v prvním případě k vymizení původního kontaminantu z prostředí, ale také k nahromadění metabolitu. **Mineralizace**, úplná biochemická oxidace organických látek až na jednoduché anorganické komponenty (oxid uhličitý a vodu). **Utilizaci organického substrátu** mikrobiální buňkou je možno shrnout následujícím schématem. [14]



Obrázek 5 - Schéma biologického odstraňování organických látek mikroorganismy [14]

Nutnou podmínkou mikrobiálního rozkladu jsou především **akceptory elektronů**. Biochemická oxidace vyžaduje finální akceptor elektronů a z tohoto hlediska je možno rozlišit biochemické procesy následujícím způsobem. [14]

Tabulka 2 - Rozdělení biochemických procesů dle akceptoru elektronů

finální akceptor elektronů	redox potenciál	označení	vnější podmínky
molekulární kyslík	>50 mV	oxie	přítomen kyslík
dusičnan	-50 - 50mV	anoxie	kyslík vyčerpan
sírany, Fe ³⁺ , organické látky	<-50 mV	anaerobie	malá nebo žádná koncentrace dusičnanů

Pro technologické využití jsou anaerobní podmínky, až na výjimky, málo výhodné a to zejména z důvodu malé rychlosti anaerobního metabolismu. Proto je většina sanačních biotechnologií provozována v aerobních (oxických, příp. anoxických) podmínkách. [14]

Základním předpokladem pro utilizaci organické látky (**kontaminantu**) je její přítomnost a dostupnost ve vodném prostředí v těsném okolí buňky. Primární příčinou biodegradability či stability jsou fyzikální a převážně chemické vlastnosti dané chemické sloučeniny. Dominantní vlastností organických kontaminantů určující jejich schopnost podléhat biologickému rozkladu je jejich chemická struktura. Biologický rozklad může probíhat pouze v tom případě, kdy daný kontaminant (organická látka) může být biochemicky degradována (přímo enzymatickou výbavou mikroorganismu nebo po adaptaci). Rozdíly v chemické struktuře jsou také příčinou značných rozdílů v rychlostech, ale i stupni biochemického rozkladu pro jednotlivé složky směsných kontaminantů. [14]

Pro syntézu buněčné hmoty potřebují mikroorganismy kromě zdroje uhlíku také **další prvky**. Jedná se zejména o dusík a fosfor, dále vápník, hořčík, draslík, železo a další stopové prvky. Optimální poměr C:N:P je uváděn v literatuře v rozmezí od 100:10:1 až do 100:1: 0,5 v závislosti na použitých metodách posuzování biodegradční aktivity a obsahu organických látek v prostředí. Ostatní minoritní živiny jsou v nutných koncentracích obvykle v půdě i podzemní vodě zastoupeny, takže jejich přidavek není nutný. [14]

V neposlední řadě ovlivňují průběh a zejména rychlost biodegradace **fyzikálně-chemické podmínky** prostředí, jako pH, teplota (popsáno dále v experimentální části) nebo přítomnost toxikantů. [14]

4.2 Typy environmentálních biotechnologií

Základní dělení používaných technologií je dle místa provedení na ex-situ, on-site a in-situ. Technologie in-situ se po té zpravidla dělí podle zaměření na saturevanou či nesaturevanou část horninového prostředí (větší úspora prostředků technologie přímo v místě znečištění). [14]

4.2.1 Technologie bioremediace in-situ

Charakter horninového prostředí má vliv na prakticky všechny aplikace biotechnologie. Primárním faktorem je propustnost zeminy a její homogenita. Tyto vlastnosti determinují možnost distribuce vstupních činitelů (akceptor elektronů, nutrienty event. mikroorganismy). Vzhledem k tomu, že pro úspěšnou biodegradaci molekuly kontaminantu je třeba jeho kontaktu s mikrobiální buňkou ve vodném prostředí, je u řady hydrofobních kontaminantů rozhodující rychlost jejich solubilizace ve vodě. [14]

4.2.1.1 Bioremediace saturevané zóny

Bioremediace u systémů pump&treat

Je založena na čerpání a zpětném zasakování podzemní vody. Využívá přirozené biodegradční aktivity přítomné mikroflóry, případně používá cíleně izolovaných bakteriálních kmenů. Ke stimulaci jejich činnosti se aplikuje provzdušňování čerpané vody a její obohacení o nedostatkové nutrienty (převážně dusík a fosfor). [14]

Air Sparging

Tato technologie stimuluje degradaci jak ve zvodnělé vrstvě půdy, tak v nesaturované zóně. Jedná se o injektáž atmosférického vzduchu pod hladinu podzemní vody. Tím dochází k dotaci podzemní vody vzdušným kyslíkem se současným stripováním rozpuštěného kontaminantu z vody. Takto vtláčený vzduch zároveň prochází nesaturovanou zónou a stimuluje tak přirozený aerobní rozklad v této vrstvě. Podle intenzity aerace a propustnosti nadloží se zařazuje odsávání vzdušiny z nesaturované zóny. [14]

4.2.1.2 Bioremediace nesaturované zóny

Tato technologie (bioventing) využívá ke stimulaci aerobních degradačních procesů vhánění atmosférického vzduchu do nesaturované zóny systémem bioventingových vrtů. Proces dotace kyslíku může být prováděn rovněž odsáváním půdního vzduchu, čímž dochází ke zrychlení přirozené infiltrace vzduchu, nebo kombinací procesu vtláčení a odsávání. Tato technologie původně vychází z čistě fyzikálně-chemické metody sanace (ventingu). V kombinaci z čerpáním podzemní vody je možno takto čistit i část saturované zóny. [14]

4.2.1.3 Přirozené snižování obsahu kontaminantu

V poslední době je stále větší pozornost věnována procesům probíhajícím v rámci přirozeného snižování obsahu kontaminantu v horninovém prostředí (natural attenuation) a jejich využití pro řešení starých plošně značně rozšířených kontaminací. Jedná se o procesy probíhající jak v nesaturované, tak v saturované zóně. Podstatou tohoto přístupu je absence jakýchkoli zásahů do přirozeného režimu horninového prostředí za současného monitoringu probíhajících fyzikálně-chemických a biochemických procesů jako je ředění, sorpce, srážení a biologický rozklad přítomných kontaminantů. [14]

4.2.2 Technologie ex-situ a on-site

Zaměřeny na čištění čerpané podzemní vody v různých typech bioreaktorů nebo biologických náplňových kolon, nebo na čištění odtěžené zeminy. Pro bioremediaci zeminy ex-situ se užívá, zejména v naší republice, tzv. landfarmingu tj. biodegradace na biodegradačních platech. Ve vyspělých zemích se nyní stále více aplikuje technologie plně kontrolovaného degradačního procesu na speciálních, zastřešených biodegradačních ložích (tzv. green houses). Při těchto technologiích je cena sanačních prací přibližně rovná postupům fyzikálně-chemickým. [14]

4.2.2.1 Bioremediace na degradační ploše

Varianta předpokládá vytěžení kontaminované zeminy. Je volena v situacích, které vyžadují jiný stupeň dodávky kyslíku, popřípadě homogenizaci kontaminovaného prostředí. Dekontaminační zásah je vždy realizován v prostoru zabezpečeném proti průsaku a odtoku znečištěné vody a má oficiální statut „biopole“, případně v dekontaminačních halách. Po úpravě zeminy (optimální poměr mezi zdrojem uhlíku (kontaminant) a dalších živin) je případně provedena inokulace rozstříkem bakteriální suspenze z bioreaktoru. Dodávka kyslíku je zajištěna obracením, přesypáním, orbou, kypřením či nucenou aerací půdy. [14]

4.2.3 Biologické čištění odpadních vod

V současné době se v převážné většině používá aerobní technologie, kterou je aktivace (styk odpadní vody a aktivovaného kalu mikroorganismů v reaktoru). Dalším možným typem čištění jsou biofiltry, kde čištění samotné je založeno na stejné podstatě jako u aktivace, rozdílem je přichycení kalu na náplni biofiltru. Část kalu putuje spolu s vyčištěnou vodou do dosazovací nádrže, kde se kal oddělí od vyčištěné vody. Voda se pak vypouští do odtoku, nebo ještě následuje dočištění.

4.2.3.1 Aktivace

Využívá se aktivovaného kalu (mikroorganismů volně se pohybujících v nádrži). Organismy se živí znečištěním, které je přítomno v odpadní vodě, snižuje tak jeho koncentraci, a tímto pochodem vodu čistí. Mikroorganismy potřebují dostatečný přísun kyslíku (aerobní proces), čehož je dosaženo provzdušňováním (aerací). Kal může být oddělen v dosazovací nádrži a vrácen čerpadlem zpět do aktivace (zvyšování hustoty aktivovaného kalu). Hlavní výhodou je vysoká účinnost procesu. Nevýhodou je menší odolnost aktivovaného kalu ve vzhledu vůči chemickým látkám. Tento nedostatek kompenzuje technologie využívající biofilmových reaktorů (MO přisedlé na pevném nosiči. [16]

Díky mnoha výhodám, se začaly využívat aerobní reaktory s biomasou přisedlou (imobilizovanou) na podklad, tzv. biofilmové reaktory. Princip aerobního biologického čištění odpadních vod v biofilmových reaktorech je v podstatě shodný s čištěním aktivací, neboť se při něm uplatňují všechny tři základní faktory tohoto procesu: aerobní mikroorganismy (především bakterie), kyslík, organická hmota, která je rozkládána mineralizačními pochody. Rozdíl oproti aktivaci spočívá v tom, že mikroorganismy smíšené kultury nejsou ve vločkách vznášejících se v aerované nádrži, ale jsou přisedlé na pevném podkladě (nosiči), na němž vytvářejí biologickou blánu (biofilm). Vedle mikrobiálního rozkladu organických látek a jiných mikrobiálních dějů (např. nitrifikace) se uplatňují i děje sorpční. [17]

Tabulka 3 - Rozdělení biofilmových reaktorů [17]

Dle nosiče biofilmu	S pevným nosičem (volně ložená náplň) S pohyblivým nosičem (rotační disky, MBBR)
Dle směru průtoku odpadní vody	Skrápěné Ponořené Rotační
Dle druhu filtrační náplně	S objemovou náplní (kamenivo, vápenec, vysokopecní struska) S plošnou náplní (plasty, porcelán)

4.2.3.2 Skrápěné biologické kolony (biofiltry)

Kultura mikroorganismů je přisedlá na materiálu, který je vložen do nádrže. Jedná se většinou o drcené plastické hmoty nebo i speciální náplně a vestavby s velkou mezerovitostí, které umožní průchod vodě a kyslíku (například plastový element nebo v našem případě využití nanovláknenné vrstvy). Největší výhodou je odolnost mikroorganismů přisedlých na náplni filtru vůči chemickým změnám [15]

4.2.3.3 Rotační diskové reaktory

V hlavní nádrži, kde probíhá vlastní biologické čištění, se vyskytují jak přisedlé, tak volně se pohybující suspendované mikroorganismy. Jako podklad pro přisedlou kulturu biomasy zde slouží rotující disky. Účinnost této čistírny záleží na velikosti, počtu a vzdálenosti jednotlivých disků od sebe. Disky jsou v nádrži připevněny tak, aby byly zhruba ze 40ti procent ve vodě a zbytek nad vzduchu. Tyto disky s přisedlou kulturou se pomalu otáčejí a zabezpečují tak dostatek živin i kyslíku pro přisedlé mikroorganismy. Výhodou je nutná menší plocha nádrže, kde probíhá samotné čištění a vysoká odolnost mikroorganismů vůči změnám v chemickém složení. Nevýhodou je nutný odvod zápachajících plynů a zároveň přívodu čerstvého vzduchu. V zimě může docházet se snížení účinnosti (nutno přitápět v prostoru biodisků nebo zamezit přístupu studeného vzduchu). [16]

4.2.3.4 Bioreaktory

Bioreaktor je systém, ve kterém dochází k promíchávání kontaminované vody a příslušných biodegradujících mikroorganismů (příp. konsorcia). Zásadní podmínkou pro úspěšnost užití bioreaktorů je udržet mikrobiální biomasu v systému, k čemuž je například v systému s aktivovaným kalem využíváno recirkulace biomasy. Moderním přístupem je imobilizace buněk na inertním nosiči v tzv. biofilmu. Použití bioreaktorů využívajících mikroorganismů ve formě biofilmu, je výhodnější, neboť mají menší rozměry a vyšší buněčnou hustotu. Imobilizované mikroorganismy se díky uchycení se na nosiči lépe brání případným nežádoucím efektům (inhibici nebo akumulaci) polutantů, jsou navíc méně citlivé vůči vnějšímu toxickému působení [15]. Mikroorganismy seskupené v agregátech jako jsou vločky či biofilm nebo se nevyznačují jen charakteristickými biochemickými a biologickými vlastnostmi, ale také odlišnými fyzikálními a fyzikálně chemickými, jako jsou mechanická stabilita, vazba vody, optické vlastnosti, difúze, sorpce, rezistence proti otěru a střižným silám atd. [19]

Jednotlivé bioreaktory se odlišují technickým řešením, typem elektronových akceptorů (aerobní či anaerobní procesy), způsobem přiživování (vsádkové, kontinuální) nebo použitými druhy mikroorganismů. Výhodou těchto procesů je, že celý biodegradační postup lze velmi dobře kontrolovat a lze tak i regulovat nejdůležitější parametry, které ovlivňují biodegradaci (koncentraci kyslíku, živin, pH, teplotu, atp.).

Prostředí ve kterém probíhají bioprocesy jsou v podstatě nádoby z trvalého a stabilního materiálu (sklo, železobetonové nádrže vystlané PP fólií) o různém objemu (od cca. 0,5 l až do objemů kolem 100 000 m³). Jsou vybaveny především:

- míchacím zařízením, přívodem vzduchu,
- měřením a regulací teploty (vnitřním nebo vnějším chlazením a ohřevem)
- měřením (regulací) pH, koncentrace rozpuštěného O₂, redox-potenciálu, salinita (vodivost), koncentrace biomasy, měřením koncentrace substrátu,
- odvodem výdechových plynů (koncentrace O₂ a CO₂ v odcházejícím plynu),
- zařízením na odběr vzorků,
- mechanickým nebo chemickým odpěňováním, aj. [41]

Tabulka 4 - Technologie metod ex-situ [14]

Biofilmové bioreaktory	Skrápěné biologické kolony (skrápěcí filtry, trickling filters) Půdní bioreaktor Rotační biofilmové reaktory (Rotační diskové reaktory) Ponořené náplně, fluidní lože (MBBR)
Aktivační procesy	
Anaerobní procesy	Halorespirace Anaerobní reaktor

V laboratorních experimentech mohou v zásadě probíhat tři základní typy kultivací:

- **vsádková kultivace** – během kultivace se do systému nepřidávají žádné živiny, samotná kultivace probíhá až do jejich vyčerpání
- **přítoková kultivace** („fed-batch“) – na začátku se naplní reaktor určitým množstvím kultivačního média a zbytek substrátu pak přitéká do systému postupně nebo konstantní rychlostí
- **průtoková (kontinuální) kultivace** – spočívá v nepřetržitém pomalém přítoku živin do systému za současného nepřetržitého odebírání kultivačního média, čímž je zajištěn dostatek živin po celou dobu kultivace a současně se naředí i eventuální nepříznivé metabolity inhibující růst mikroorganismů. Z technologického hlediska je nejvýhodnější co nejvíce prodloužit logaritmickou fázi růstu mikroorganismů, což se děje právě při kontinuální kultivaci. [41]

4.3 Charakteristika základních podmínek biodegradačních procesů

4.3.1 Analýza místních podmínek

Před samotným výběrem biodegradačního procesu je nutné stanovit klíčové fyzikální, chemické a biologické parametry prostředí, které značně ovlivňují rychlost biodegradace a její průběh (faktory prostředí). Chemické analýzy zahrnují měření pH, celkové množství organického uhlíku, dusíku, fosforu, železa, kyslíku apod. V případě dekontaminace zemin je nutno popsat typ zeminy (obsah jílu, organických látek, velikost částic), u vody pak obsah rozpuštěných pevných látek. Mikrobiologické analýzy zahrnují biologickou spotřebu kyslíku, počet mikroorganismů a případné batch a kontinuální kultivační experimenty. V případě in-situ procesů je nezbytné také důkladně charakterizovat hydrogeologické vlastnosti prostředí (určení hladiny spodní vody, rychlost proudění, přítomnost akceptorů elektronů (O₂, dusičnany), pH, teplota, aj.) [15]. Důvod provádění těchto testů je stanovit zda je vhodné užít biodegradačních procesů a zda mohou skutečně probíhat.

V diplomové práci je tomuto tématu věnována kapitola 7.2 *Hlavní kontaminace reálné průmyslové vody CHBČOV Draslovka Kolín*. A následovně v praktické části kapitola 9 *Průběh degradačních procesů (laboratorní zkoušky)*, kde jsou uvedeny analýzy pH, ORP, analýzy živin, CHSK, parametry kultivačního prostředí a další.

4.3.2 Potřeby a limitující faktory

Základ je výběr vhodného biodegradačního procesu, což vyžaduje především charakterizaci kontaminantu (sledované parametry jsou například chemické složení, koncentrace, toxicita, rozpustnost, těkavost aj.). Nezanedbatelným faktorem je také biodostupnost a toxicita a s tím spojená i biodegradabilita. Následuje výběr vhodného mikroorganismu (případně společenství MO) a informace o jejich biodegradační dráze, možných meziproduktech a rychlosti degradace. Jak bylo zmiňováno výše, biodegradační přístupy jsou ve srovnání s klasickými fyzikálně-chemickými metodami obecně levnější, vyžadují však mnohem detailnější vstupní informace. Chybějící charakterizace mikrobiální fyziologie a podmínek celého procesu může vést ve svém důsledku k horším výsledkům a navýšení nákladů ve srovnání s klasickými abiotickými metodami. [15], [18]

Praktická část této práce toto řeší například v kapitole 7.2 *Hlavní kontaminace v reálné průmyslové odpadní vodě CHBČOV Draslovka Kolín*. Výběr vhodného mikroorganismu lze nalézt v kapitole 4.4, informace o jeho biodegradační dráze zde není uvedena, neb toto nebylo cílem práce. Avšak do navazujících prací by bylo toto vhodné zakomponovat.

4.3.3 Optimalizace podmínek

Optimum biodegradace se dá zařadit do oblasti blízko neutrálního pH a při teplotách v rozmezí 20 – 30 °C. Důležitou podmínkou je optimalizace dodávky kyslíku (pro aerobní procesy O₂ vháněn aeračními pumpami) a nutrientů (dávkování živin například čerpadly). Nedostatek kyslíku výrazně limituje rychlost biodegradace. Bohužel ani samotný kontaminant v mnoha případech není dostačujícím zdrojem uhlíku a energie, je tedy nutné dodat jiný vhodný kosubstrát, případně mohou být biodegradační procesy intenzifikovány dávkováním dusíku a fosforu.

Nalézt optimální hodnoty biodegradačního procesu (pro praktickou aplikaci CHBČOV Draslovka Kolín, v laboratorních podmínkách) je prvořadým cílem práce. Výsledky jsou uvedeny v experimentální části 9 *Průběh degradačních procesů (laboratorní zkoušky)*.

4.3.4 Předpověď degradační rychlosti

Biodegradační rychlost je určujícím faktorem pro návrh designu celého procesu a dalších zařízení. Velice vhodným způsobem je posoudit biodegradační rychlost kontaminantu během laboratorních experimentů. Moderním přístupem je také využití matematických modelů, neboť experimentální měření mohou být komplikována nedostatečným množstvím mikroorganismů a dalšími faktory (T, O₂, dostupnost a druh kontaminantu, pH, ORP, na výskytu látek, které jsou toxické pro mikroorganismy, jako rtuť a jiné inhibitory metabolismu mikroorganismů atp.) [15]. Velkou výhodou posuzování chování procesů pomocí matematického modelu je zvláště ekonomické hodnocení a nulové riziko havárie, které jinak hrozí při provozních (laboratorních i průmyslových) experimentech.

Posouzení biodegradační rychlosti se věnuje experimentální část práce. Využití matematického modelu je lehce nastíněno v kapitole 8.5 *Ideální proces adaptace*.

4.4 Výběr vhodného mikroorganismu

Jelikož je tato práce založena na laboratorním ověřování a optimalizaci reálné praxe, jsou tak přejaty veškeré určující parametry dané technologie z ČOV Lučební závody Draslovka Kolín. Jedná se především o charakter kontaminace odpadní vody a daný adaptovaný mikroorganismus. Tento MO byl předem izolován, laboratorně ověřován a adaptován na Vysoké škole chemicko-technologické (VŠCHT) v Praze. Ve zdejších podmínkách bylo hlavním cílem sledovat schopnost bakteriálních populací degradovat anilin ve volné formě a formě vázané na nosič. Byl sledován nárůst mikrobiálních populací v závislosti na různých kultivačních podmínkách (pH, teplota, složení media), úbytek anilinu a schopnost přirozené adheze na polyethylenový nosič, sestaveny byly také kolonové systémy pro ověření biodegradační aktivity studovaných kmenů za daných podmínek. [19]

Hlavní pozornost byla věnována screeningu několika kmenů vhodných pro biodegradaci anilinu ve vodním prostředí a jejich schopnost kolonizovat polymerní nosiče. Vynikajících výsledků dosahoval také kmen *Rhodococcus*, tento mikroorganismus byl schopen růst na anilinu jako jediném zdroji uhlíku. Důležitým výsledkem bylo, že s imobilizací buněk na nosiče vzrostla rychlost degradace anilinu v mediu. V průběhu kultivace s reálnou odpadní vodou bylo patrné, že tato voda má výrazný deficit P-zdroje. Také bylo během kultivace pozorováno uvolňování částí biofilmu z nosičů. Reálná voda pravděpodobně obsahovala povrchově aktivní látky, respektive látky, které u nosičů indukovaly odpoutání biofilmu z povrchu nosiče. [19]

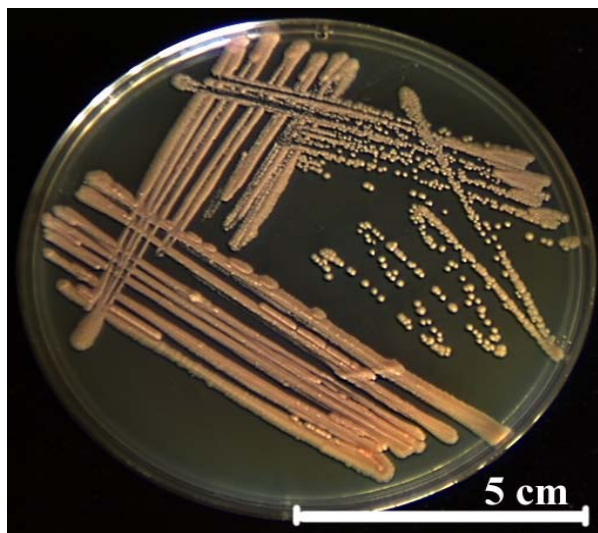
4.4.1 *Rhodococcus*

Mikroorganismy ve srovnání s vyššími organismy jsou obecně odolnější k nepříznivým životním podmínkám a mají velikou adaptační schopnost regulovat svůj metabolismus k proměnlivým podmínkám životního prostředí [20]. Každý MO vyžaduje své specifické optimální vnější podmínky. Rod *Rhodococcus* je heterogenní skupina mikroorganismů, která je jedna z nejčastěji se vyskytujících bakterií v životním prostředí, obzvláště v půdě a vodním ekosystému a z mnoha příčin je slibným kandidátem pro tvorbu inokula v biodegradačních procesech. V prostředí mohou setrvávat dokonce i za velmi nepříznivých podmínek [21]. Jejich znamenité chemické pochody dovolují degradaci rozsáhlé řady kontaminantů (od jednoduchých uhlovodíků, přes chorované uhlovodíky, aromáty, nitroaromáty až ke chlorovaným polycyklickým aromatickým sloučeninám, PCB, chlorderiváty fenolu a mnoho dalšího), ale také i surfaktantů a polymerů [22], čehož využívají jako zdroje uhlíku a energie, což se využívá pro čištění odpadních vod. Jednotlivé druhy se adaptovaly jak ve smyslu fyziologickém (mohou tvořit biosurfaktanty, dosahují vysoké snášenlivosti k abnormálním koncentracím polutantů, jsou schopné adheze k široké škále povrchů), tak také z hlediska genetického (velice efektivní procesy) [21].

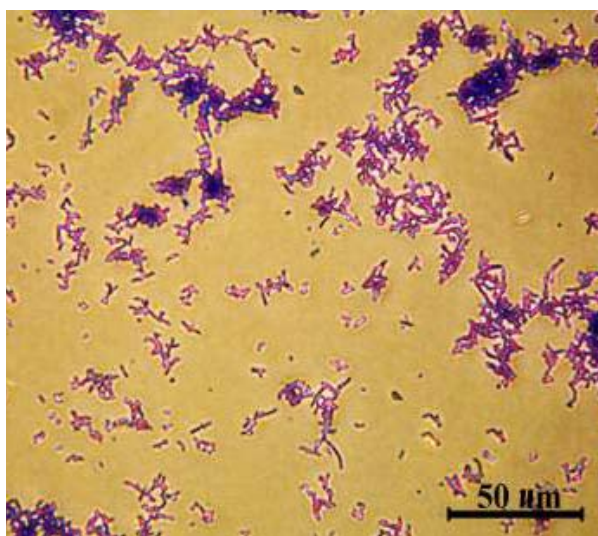
Rodokokální buňka je buňkou prokaryotní¹. Od vnějšího prostředí je oddělena buněčnou stěnou, pod níž se nachází cytoplazmatická membrána. Vnitřní prostor není dále dělen žádnými membránovými strukturami, obsah je tvořen cytoplazmou a genetickým materiálem. Cytoplazma je vodný roztok enzymů, produktů metabolismu, rezervních látek a iontů [21]. Přítomnost kyseliny mykolové v buněčné stěně udílí povrchu buněk rodokoků velkou hydrofobitu, což umožňuje degradaci hydrofobních

¹ Bakteriální buňka je buňkou prokaryotní, tzn. že obsahuje buněčnou stěnu (která ovšem může chybět), cytoplazmatickou membránu a protoplast, který se skládá z nukleoidu, ribozomů, inkluzí, cytoskeletu a cytosolu, nemají diferenciované jádro

polutantů a ovlivňuje také tvorbu biofilmu. Navíc složení buněčné stěny je odpovědí mikroorganismu na vlivy vnějšího prostředí. Některé druhy jsou psychrotrofní, což může být důležité při biodegradaci v chladných biotopech. [21] Z mnohých výzkumů vyplývá, že bakterie rodu *Rhodococcus* jsou v prostředí široce rozšířeny. Jsou schopny dobře přežít i ve znečištěných oblastech s minimem nutrietů. Dozajista není náhoda, že rodokové jsou nejčastěji volené bakterie proti toxickým polutantům v biotechnologických procesech. Jak roste množství dostupných informací o rodokocích, je jasné, že poroste komerční využití jejich buněk a enzymů. [21]



Obrázek 6 - Makro fotografie *Rhodococcus* na Petriho misce



Obrázek 7 - *Rhodococcus* po Gramově barvení, foto Ing. T. Krulíková VŠCHT

Tabulka 5 - Základní vlastnosti bakterie *Rhodococcus* [23]

Reakce na Gramovo barvení	G+
Tvar a uspořádání buněk	krátké i delší tyčky s náznaky větvení
Velikost buňky [μm]	0,8-1,0; 5-15
Pohyblivost	nepohyblivý
Vztah ke kyslíku	aerobní (malé nároky na kyslík)
Způsob výživy	chemoorganotrofní
Optimální kultivační teplota	30 °C
Speciální požadavky na výživu a růst	-

5 Nosič biomasy

Fixace mikroorganismů v přirozeném biofilmu je technologicky využívána již od počátku minulého století. Biofiltry používané pro čištění splaškových odpadních vod byly v minulosti masivně rozšířené i v ČR stejně jako tzv. anglické filtry využívané ve vodárenství pro pomalou filtraci surových vod. Biofiltry používané v čistírenství byly vesměs zkrápěné kolony, jejichž zásadní nevýhodou bylo zarůstání nosiče, limitace s dodávkou kyslíku a obecně nižší účinnost ve srovnání s klasickým aktivačním procesem. Tyto nevýhody většinou odstraňují kombinované systémy s biomasou jak fixovanou v ponořeném biofilmu, tak volnou (ve vznosu). První technologie využívaly fixované nosiče biomasy ve formě různých vestaveb. Tyto techniky neodstraňují s jistotou možnost zarůstání náplně a rovněž komplikují údržbu stavebních prvků bioreaktorů, zejména aeračních systémů. [24]

5.1 *Přínos fixace mikroorganismů v biofilmu*

Biodegradace cizorodých toxických látek často naráží na koncentrační limity dané jejich biostatickými až biocidními účinky. Využití mikroorganismů schopných vytvářet přirozený biofilm tak nabízí nespornou výhodu. Zejména díky jejich obecně vyšší rezistenci k toxikantům a možnosti udržení i pomalu rostoucích mikroorganismů v systému. Fixace degradérů specifického znečištění ve formě přirozeného biofilmu je podmiňující nejen v případě primárně pomalu rostoucích mikroorganismů, ale i v situacích, kdy rozhodující mikroorganismus roste pomalu ve specifických podmínkách (druh a koncentrace substrátu, salinita a zejména teplota). [24]

5.2 *Princip technologie využívající nosiče biomasy*

Výše uvedené nevýhody odstraňují systémy s nosičem biomasy ve fluidním loži, kde je také možné regulovat intenzitou aerace střížné síly na povrchu nosiče a do značné míry tak v případě potřeby regulovat mocnost biofilmu. Tyto nosiče jsou čerpatelné, čímž umožňují násobně jednodušší obsluhu aeračního systému. Zásadní výhodou je rovněž široké spektrum plnění reaktoru nosičem a z toho plynoucí možnost intenzifikace nebo naopak snížení výkonu. [24]

Znečištění obsažené v přiváděné odpadní vodě je rozkládáno pomocí mikroorganismů narostlých na vnitřní struktuře nosičů. Samotné nosiče jsou pak v reaktoru zadržovány pomocí odtokových sít. Procesy založené na biofilmové biomase mají rozličné výhody, mezi které patří vyšší akceptovatelné objemové zatížení systému ve srovnání s klasickou aktivací, dále zvýšená odolnost vůči toxicitě a změnám v zatížení, jednoduchý provoz a systém, který není citlivý vůči bytění kalu. Flexibilita této technologie umožňuje navrhovat velice kompaktní a efektivní samostatné řešení a také provádět intenzifikace stávajících biologických procesů, často bez nároků na výstavbu nových nádrží. [25]

V reálné praxi již byly ověřeny jak různé nespecifické nosiče biomasy, tak zcela původní komerční zahraniční technologie. Obecnému rozšíření těchto technologií brání, přes jejich nesporné výhody, cena nosiče i celé dodávky technologie, stejně jako dostatečné reference. Cena hraje jistě významnou úlohu v případě běžných komunálních

vod, kde se náklady pohybují v desítkách Kč/m³. V případě čištění specificky nebo extrémně znečištěných odpadních vod, kde jejich společné čištění na běžných komunálních ČOV není možné a kde náklady na jejich čištění jsou významně vyšší, je aplikace těchto technologií již přijatelná. [24]

5.3 Hlavní požadavky na nosič biomasy

Nosič biomasy je určující prvek této technologie, který musí splňovat obzvláště následující vlastnosti:

- a) **Kolonizovatelný.** Materiál musí být biochemicky inertní, chemicky a fyzikálně stabilní, současně morfologicky vhodný.
- b) **Maximální specifický povrch.** Podobně jako náplně stripovacích či absorpčních kolon musí být poměr povrchu k objemu maximální.
- c) **Měrná hmotnost** musí být srovnatelná s vodou, resp. s odpadní vodou. I po nárůstu biomasy případně sraženin musí být komplex densitně srovnatelný s médiem. Tato vlastnost je zásadní pro minimalizaci nákladů na míchání.
- d) **Optimální velikost** vzhledem k technickému řešení odtokových armatur a složení odpadní vody (možný obsah nerozpuštěných látek, vznik sraženin).
- e) **Cenová přijatelnost.** [24]

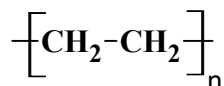
Z výše uvedených důvodů jsou velice vhodným typem nosiče polymery. Jejich charakteristické vlastnosti jsou postačující pro vytvoření stabilního nosiče. Stávající komerční technologie (například Anoxkaldnes) používají polymer PE (polyethylen). Původní technologie TUL je (v této práci) založena na využití polymerů PP a PU (polypropylén, polyuretan). Samozřejmě je možné využít libovolného polymeru, který by splňoval výše uvedené požadavky na nosič biomasy.

5.3.1 Výhody polymerních nosičů

Bakterie přirozeně se vyskytující v přírodě mají tendence přirůstat k libovolnému povrchu, který se vyskytuje v jejich bezprostředním okolí. Prapůvodně se jednalo například o kamenivo v řekách, které nakonec sloužilo, jako jeden z prvních reálných aplikací na čistírnách odpadních vod. Ovšem tento materiál nebyl příliš vhodný, zejména pro jeho vysokou hmotnost a nízký aktivní povrch. Hledaly se proto materiály, které tyto nevýhody vykompenzují. Přešlo se tak na lehce dostupné a levné materiály, jakým byly plastové nasekané drenážní trubky („husí krky“), keramzit či perlit. Ty již splňovaly náročnější požadavky, ale jejich provozním nedostatkem byla vysoká pravděpodobnost zarůstání náplně, což vedlo k tvorbě anaerobních zón, a dále pak ke snížení aktivního povrchu a účinnosti. [9] Tento prvek se dále technologicky zdokonaloval až do dnešní podoby, při níž je zachována jednoduchost výroby, vysoká efektivita a velká možnost variability. Nevýhodou jsou jejich nemalé náklady, komplikovaná regenerace (recyklace) odpadů a možnost degradace nosiče. Pro některé platí teplotní omezení použitelnosti a relativně nízká tuhost výrobku.

5.3.1.1 Obecné vlastnosti polyethylenu (PE)

Polyethylen (PE) je termoplast, který vzniká polymerací ethenu. PE (Obrázek 8), patří mezi nejjednodušší polymery neobsahující žádné polární ani jiné skupiny schopné tvořit silné mezimolekulární vazby. Běžná PE vlákna jsou měkká a málo pevná. Pro zajištění dostatečné pevnosti je třeba použít PE s extrémně vysokou molekulovou hmotností. [26]



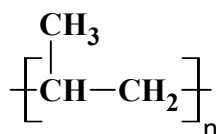
Obrázek 8 - Struktura polyethylenu (PE)

Další možné využití PE

Z polyethylenu jsou vyráběny například tašky, mikroten, láhve na saponáty, mísy, textilie chránící proti pořezání, propíchnutí resp. prostřelení. Výroba extra-lehkých helem, silných námořnických lan a kompozitních struktur. [26]

5.3.1.2 Obecné vlastnosti polypropylenu (PP)

Polypropylen (PP) je termoplastický polymer, používaný v mnoha odvětvích potravinářského a textilního průmyslu a v laboratorních vybaveních. Jako základní surovina pro výrobu se používá propen. Polypropylen vyniká velmi dobrou chemickou a mechanickou odolností. [26]



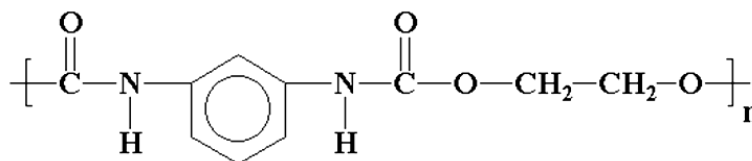
Obrázek 9 - Struktura polypropylenu (PE)

Další možné využití PP

Pro výrobu fólií a vstřikovaných výrobků, textilních pásek (pytle a vaky), netkaných textilií (dětské plenkové kalhotky, jednorázové obleky, textilie pro stavebnictví a zemědělství). Stejně jako polyethylen nachází uplatnění v automobilovém průmyslu, při výrobě hraček, kuchyňského nádobí či bazénů. Velké využití našel jako výchozí surovina pro výrobu obalů na potraviny (kelímky na jogurty, tuky, mražené výrobky i saláty). [26]

5.3.1.3 Obecné vlastnosti polyuretanu (PUR)

Vznikají polyadici glykolů s polyisokyanáty. Jsou dobře odolné vůči povětrnostním vlivům, běžným rozpouštědlům, benzínu, olejům. Vyznačující se vysokou elasticitou a značnou chemickou odolností. Jsou celkem lehké a velice pevné. [27]



Obrázek 10 - Struktura polyuretanu (PU)

Další možné využití PUR

Měkké pěnové hmoty se používají jako čalounění a izolace (těsnící, montážní pěny). Tvrdé pěnové hmoty se používají jako izolace. Polyuretanová lepidla se používají k lepení polymerů (kaučuků s kovem a sklem - dvousložková nerozpustná lepidla). Jsou výchozí surovinou při přípravě nátěrových hmot, laků (impregnaci v textilní průmyslu) a textilních vláken. [27]

5.3.1.4 Souhrnné vlastnosti PP, PE, PU

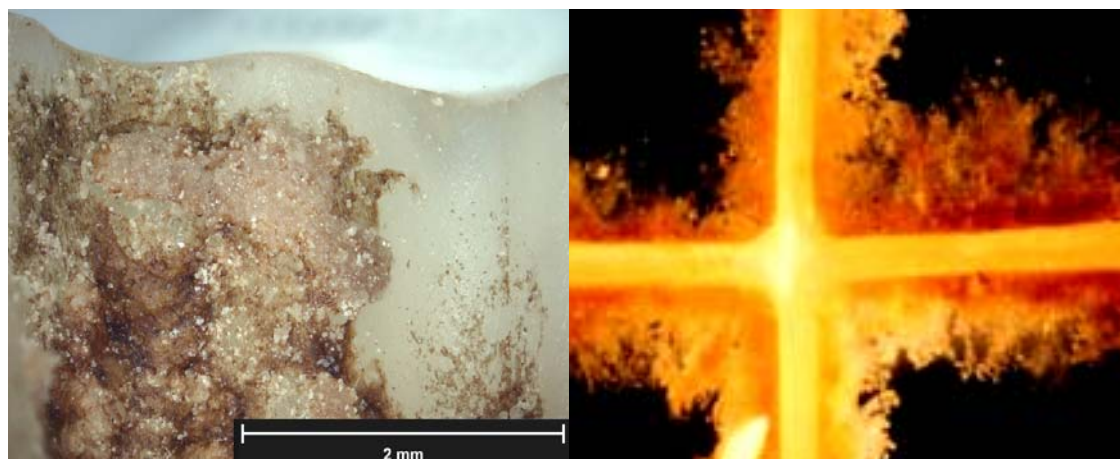
Hodnoty v následující tabulce jsou ovlivněny podmínkami zpracování (modifikace, přísady materiálů a mnoho dalšího).

Tabulka 6 - Základní vlastnosti užitých polymerů [28]

Vlastnosti		PE (KR) 900 - 920	PP (BA) 900 – 920	PU (nano) 1200
Hustota	kg/m ³			
Mechanické vlastnosti				
Tažnost	%	>400	700	13
Elektrické vlastnosti				
Povrchový odpor	Ω	>10 ¹⁴	1,00E+14	1,00E+13
Teplotní vlastnosti				
Teplná vodivost	W/K m	0,42	0,22	0,245
Koeficient délkové roztažnosti	10 ⁻⁶ /K	120-150	100-200	120
Teplota tavení popř. zesklivatění	°C	135	163	98
Max. teplota krátkodobá	°C	100	140	100
Max. teplota dlouhodobá	°C	90	100	80
Min. teplota použití	°C	-80	0	-40
Jiné vlastnosti				
Nasákavost	%	<0,1	<0,1	3,3

5.4 Polyethylenové nosiče biomasy („KR“)

Zde se uplatňuje princip využití mikrobiální biomasy narůstající ve formě biofilmu na povrchu plastových nosičů (zejména vhodné pro čištění odpadní vody). Jádrem procesu jsou nosiče vyrobené z polyethylenu, který má hustotu mírně nižší než voda. Tyto nosiče se běžně udržují v neustálém pohybu působením dmýchaného vzduchu v aerobním systému (středně bublinná aerace). Nosiče bývají kompaktní a jednoduché na provoz. Flexibilita této technologie umožňuje navrhovat velice kompaktní a efektivní samostatné a jednoduché řešení a také provádět snadnou intenzifikaci stávajících biologických procesů, často bez nároků na výstavbu nových nádrží, s nenáročnou údržbou. [25]



Obrázek 11 - Detail biofilmu na nosiči Anoxkaldnes [25]

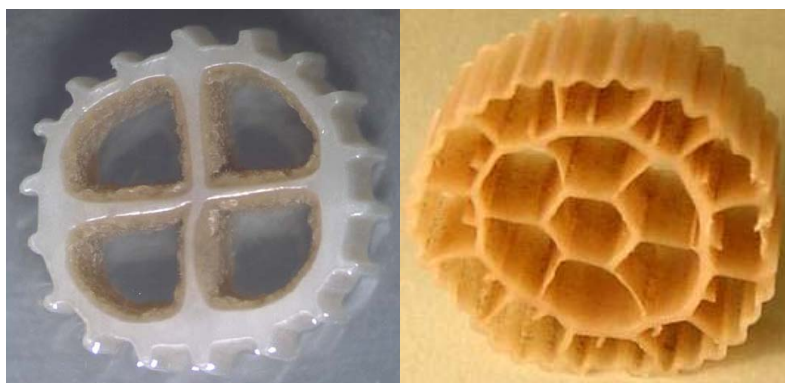
5.4.1 Anoxkaldnes™ MBBR

V technologii AnoxKaldnes™ MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor -pohybující se lože v biofilmovém reaktoru) mohou PE nosiče tvořit až 70 % objemu nádrže a jsou navrhovány tak, aby suspendovány ve vodě poskytovaly co největší chráněný povrch pro nárůst biofilmu a optimální podmínky pro rozvoj bakteriálních kultur. Nosiče jsou vyrobeny z polyethylenu se speciálními aditivami, kterými se dosahuje žádaná specifická hmotnost materiálu. [25]



Obrázek 12 - Přibližně 450 ČOV ve 47 zemích světa využívá technologie AnoxKaldnes [25]

Tato technologie je aplikovatelná jak pro čištění průmyslových, tak i komunálních odpadních vod. Nespornou výhodou je vysoká flexibilita procesu, která umožňuje kombinovat systém v různém uspořádání s klasickou aktivací tak, jak je nejvýhodnější pro efektivní rozklad daných znečišťujících látek. Od zprovoznění ČOV vykazuje stabilní účinnost 99 % odstranění BSK₅ a 80–85 % CHSK. Zajímavým provozním parametrem je nízká produkce přebytečného kalu 0,12–0,17 kg NL/kg odstraněné CHSK, která vede k podstatnému snížení provozních nákladů ČOV. Velice efektivní je také při odbourávání dusíku (podporuje růst pomalu rostoucích nitrifikačních bakterií). [25]



Obrázek 13 – Technologie Anoxkaldnes, označení K1 průmyslový, K3 komunální [25]

Technologie využívá biofilm narůstající na vnitřním povrchu ve struktuře nosičů. Jedná se o polyetylenová „kolečka“ s různou morfologií mřížek uvnitř (podle konkrétního typu), jež je uzpůsobena k narůstání biofilmu tvořeného organotrofními i autotrofními mikroorganismy, tvar je rozhodující pro požadavky na transfer hmoty substrátu a kyslíku k mikroorganismům. [25]

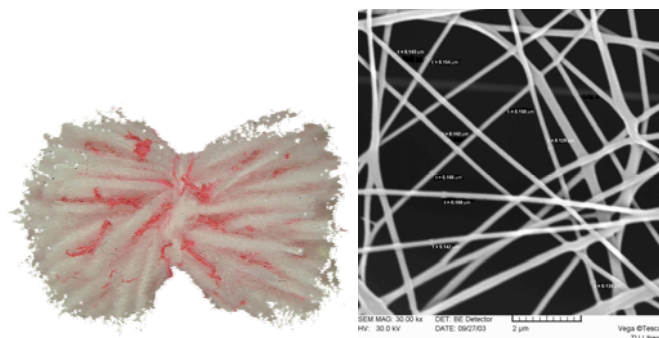
Průměr užitého nosiče K3 je 25 mm (*Obrázek 13*), celkový užitý povrch je $600 \text{ m}^2/\text{m}^3$, z čehož chráněný vnitřní povrch činí $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$. Hustota použitého materiálu nosiče je přibližně $1000 \text{ kg}/\text{m}^3$ zajišťuje, že po nárůstu biomasy na nosiči se hustota biokomplexu pohybuje na úrovni odpadní vody a pro jejich udržování ve vznosu je zapotřebí dodávat minimum energie.

5.5 Vláknenné polypropylenové, polyuretanové nosiče („BA“)

5.5.1 Charakteristické rysy nanovláknenných polymerů

Jde o zcela původní technologii výroby nanovláknenné vrstvy na polymerním nosiči, která byla vypracována na Katedře netkaných textilií, Fakulty textilní, TUL (viz. kapitola 5.5.2 *Výroba nanovláknenných polymerů* [29], [26]). Výsledný tvar nosiče, tzv. „nano-bambule“ byl vyprodukován na Ústavu nových technologií a aplikované informatiky, fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, TUL.

Jde o polymerní nosič (v tomto případě PP, obecně možný libovolný polymer), který ovšem není z „tvrdého“ polymeru o předem daném tvaru (jak je tomu u nosiče Anoxkaldnes), ale jedná se o flexibilní a poddajný, ale zároveň velice stabilní vláknenný polymer (visko-elastické těleso, jehož významnou schopností je relaxace napětí, tzv. tvarová paměť). Vyráběn je v optimálně sférickém tvaru (tzv. „nanobambule“, *Obrázek 14*), což umožňuje maximální optimalizaci požadavků na nosič biomasy (dle odstavce 5.3 *Hlavní požadavky na nosič biomasy*).

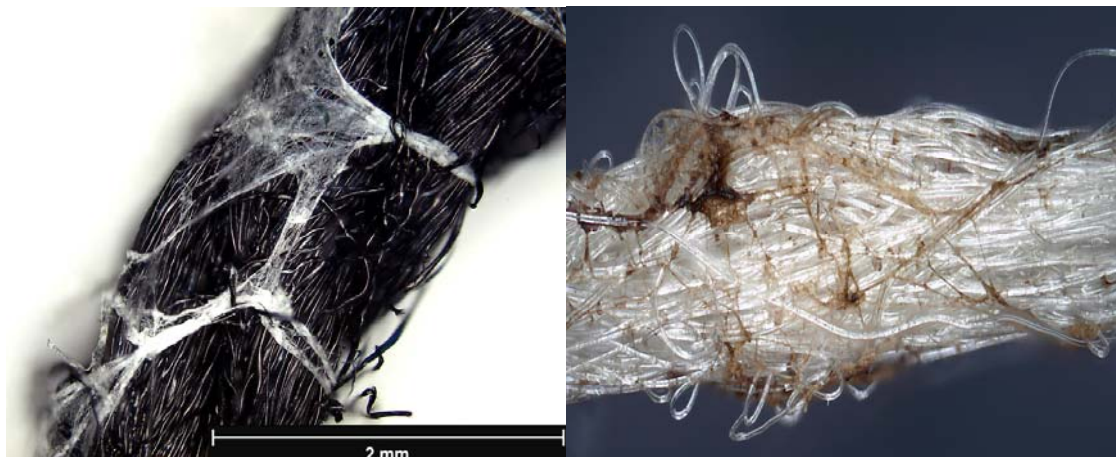


Obrázek 14 – Technologické řešení nanovláknenného nosiče („nanobambule“), detail nanovláknenné vrstvy (SEM mikroskopie) [30]

Technologický způsob výroby (chaoticky propletená vlákna) je velice morfologicky pozoruhodný, neboť prostorové obloučky jednotlivých vláken velice zvyšují výsledný povrch, který je navíc podpořen nanovláknennou vrstvou s velkým specifickým povrchem (až tisíce m^2/g [26], *Obrázek 15*). Nosiče tak mají vysokou porositu při velmi malých rozměrech pórů. Kombinace obou polymerů (PP nosná nit' $900 - 920 \text{ kg}/\text{m}^3$ a PU nanovláknenná vrstva $1200 \text{ kg}/\text{m}^3$) zajišťuje měrnou hmotnost srovnatelnou s odpadní vodou, a to i po kolonizaci bakteriemi (možnosti kolonizace jsou studovány v experimentální části této práce). Velkou výhodou této technologie je možnost kombinovat polymery a tím nastavovat densitu nosiče (od hustoty cca. $900 \text{ kg}/\text{m}^3$ až po $1200 \text{ kg}/\text{m}^3$), v podstatě přímo „na přání zákazníka“. Další výhody nanovláknenného PP nosiče je značná trvanlivost, snadná formovatelnost, odolnost vůči chemikáliím, ovšem je málo tepelně odolný.

Rozměry nosiče jsou srovnatelné s komerčně dostupnými nosiči Anoxkaldnes, zejména z důvodu lepší srovnatelnosti. Průměr cca. 3 cm, celková délka nitě na jeden

nosič činí 5 m. Struktura je zcela libovolná, optimálně sférického tvaru (minimalizace nákladů, například i na míchání). Cenové hledisko nebylo ještě při ukončení této práce ještě stanoveno.



Obrázek 15 – Detailnější pohled na nanovláknennou vrstvu na polymerním nosiči, dva týdny kolonizovaný nanovláknenný nosič (MO kolonizující nanovrstvu)

Významnou výhodou této technologie je možnost narůstání bakteriálního biofilmu nejen na povrchu nosiče, ale také blížeji k jeho středu (uvnitř nosiče), kde jsou bakterie mnohem lépe chráněny před toxickými vlivy okolního prostředí a zároveň je umožněno pronikání substrátu a kyslíku k mikroorganismům. Při této technologii je užita středně bublinná aerační technika, která je lepší pro promíchávání a homogenizaci a dostačující pro okysličování systému. Určení technologických parametrů fluidního bioreaktoru a stanovení parametrů souvisejících s hydraulickými parametry nádrže a režimu (dodáváním a spotřebou kyslíku na základě respirační rychlosti) bylo stanoveno v diplomové práci Miloše Rejmana „*Určení technologických parametrů fluidního bioreaktoru s využitím „nanobambulí“ jako nosiče biomasy*“.

Další opodstatněné hledisko, které má do značné míry významný vliv (například i na konečnou cenu nosiče), je přítomnost nanovláknenné vrstvy. Zda je nanovláknenná vrstva skutečně nezbytná ke kolonizaci bakteriální populace na nosič či nikoli. Tato varianta je diskutována dále v experimentální části. Obecně vzato, se nanostruktur využívá pro jejich vysoký styčný povrch. Bakteriím to tak umožňuje vysokou adhezivitu, což v důsledku zjednodušuje imobilizaci bakterií, zejména v úvodních fázích kolonizace povrchu nosiče (v experimentální části doloženo fotodokumentací).

5.5.2 Výroba nanovláknenných polymerů

Jedná se o moderní technologii, která k přípravě ultra jemných vláken (jejichž průměr se pohybuje v rozsahu do 1000 nm) užívá elektrostatických sil. Takováto nanovláknna mají řadu významných vlastností, které je činí výbornými pomocníky v široké řadě aplikací jako například vysoce účinné filtry, separační membrány, výztuhy pro kompozitní materiály, biologické aplikace, tkáňové inženýrství. Výjimečnou vlastností je velký měrný povrch vlákna (poměr povrchu vlákna k jeho objemu), velká pórovitost a malý rozměr pórů. [31]

Podstata celého procesu je uveřejněna v publikaci TUL viz. literatura [31], jedná se o metodu Nanospider, tento způsob nanovláken byl vyvinut na Katedře netkaných textilií, Technické univerzity v Liberci.

5.5.3 Příprava nanovláknenných nosičů před jejich použitím

Při výrobě nanovláknenných nosičů se musí užívat avivážních prostředků (vodné emulze minerálních olejů, emulgátorů a povrchově aktivních tenzidů), která snižují tření při zvlákňování a dloužení. Koriguje se tím soudržnost vláken [29] a zabezpečují dokonalé smočení a proniknutí lázně do textilie [32]. Z tohoto důvodu je vhodné před užitím těchto nosičů je řádně „proprat“, neboť již při nízkých teplotách tenzidy velice podstatně mění reakční podmínky na fázovém rozhraní (ovlivňují energetické poměry na rozhraní, snižují povrchového napětí) [32]. Jejich přítomnost na nosiči tak může ovlivňovat adhesivitu mikroorganismů k povrchu, případně jejich nechtěnému uvolňování z povrchu, navíc mohou na MO působit toxicky. Opláchnutím se tak odstraní případné nečistoty, prací prostředky a chemikálie užívané při jejich výrobě.

6 Průmyslové odpadní vody

Abychom k biodegradaci odpadních vod mohly využít dané mikroorganismy je nutné znát také základní charakterizaci OV. Velká pozornost je věnována odpadním vodám, zejména z průmyslových závodů a výroben, které obsahují například odpad ze závodních kuchyní a jídelen, vody srážkové, odváděné z areálu závodu, vody chladicí a zejména vody technologické, které jsou vedlejším produktem průmyslových výroben. V mnoha případech tvoří látky v těchto vodách svým množstvím i charakterem nejvýznamnější složku z celkového znečištění.

Průmyslové vody jsou specifické, často extrémně koncentrované, s obsahem toxických látek. Proto se s výhodou využívá biofilmového procesu, který je mnohem odolnější, neboť zde často nastává problém s vysokými koncentracemi, kolísání přítoku OV, aj. Díky hospodářskému růstu se v poslední době v průmyslu skýtá mnoho příležitostí, kde může být tato metoda nápomocná. Vyšší finanční prostředky v průmyslu tak dovolují věnovat nemalou částku na vývoj nových technologií.

6.1 Látky obsažené v průmyslových vodách

Průmyslová výroba je širokospektrální sféra, která tak zapříčiňuje velice různorodou skladbu odpadních vod, o různých koncentracích a složení kontaminantů. V průmyslových vodách z výrobních podniků jde zejména o látky syntetické a tzv. xenobiotika, případně jsou látky přítomny v příliš vysoké koncentraci, a tak mohou na mikroorganismy působit také toxicky.

6.1.1 Látky organické

Přírodní organické látky (lipidy, sacharidy, proteiny aj.) jsou vesměs biologicky dobře rozložitelné. S výhodou se tak jejich sumární koncentrace vyjadřuje jako biochemická spotřeba kyslíku (**BSK**) [33], která je definována jako množství kyslíku spotřebované za definovaných podmínek, v objemové jednotce mikroorganismy při biochemickém rozkladu organických látek přítomných ve vodě za aerobních podmínek [34]. Vyjadřuje se v $\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$.

Mezi neužívanější metody pro sledování účinnosti biologického rozkladu směsi organických látek patří stanovení sumy koncentrace organických látek v kyslíkových jednotkách jako **CHSK_{Cr}**, tj. v mg kyslíku nutného na oxidaci přítomných organických sloučenin. Touto metodou je možno stanovit téměř všechny organické sloučeniny s výjimkou některých aminosloučenin a heteroaromatických sloučenin s atomem dusíku v molekule. Výhodou tohoto stanovení je to, že zjišťuje koncentraci celkové sumy látek včetně případných meziproductů, čehož je možno alternativně využívat při sledování průběhu bioremediace. [14] Při hodnocení průmyslových odpadních vod je třeba věnovat zvýšenou pozornost možné přítomnosti anorganických látek, které se v podmínkách stanovení CHSK oxidují a tím zkreslují její hodnotu jako míru obsahu látek organických. [33] Vyjádřena je v jednotkách mg l^{-1} .

Další významnou skupinou látek jsou látky povrchově aktivní (**PAL**), což jsou sloučeniny, které přidány i v malém množství do vody, způsobují výrazný pokles povrchového napětí. Jsou přirozeného původu (mýdla) nebo umělé (tenzidy, prací prostředky), a proto je nacházíme běžně i ve splaškových vodách, ve zvýšených koncentracích v odpadních vodách. [33] Jejich potenciálně velký vliv na MO a jejich

tvorbu biofilmu se skrývá zejména v úvodní fázi kolonizace, proto je nutné brát zřetel na obsah PAL ve vodách ještě před samotným testováním biologické rozložitelnosti MO.

6.1.2 Látky anorganické

K nejběžněji se vyskytujícím látkám ve vodách patří **soli**. Vodní organismy a mikroflóra biologického čištění snáší poměrně vysoké koncentrace solí [33], ovšem na mikroorganismy může mít vysoká koncentrace neblahý vliv, zejména v OV může působit až toxicky, pokud na salinitu nejsou MO adaptovány. Ovšem ani MO svými biologickými pochody soli neodstraňují [34], ty tak dále odtékají ve vyčištěné vodě. Obsah rozpuštěných i nerozpuštěných látek ve vodě je důležitým chemickým ukazatelem jakosti vody.

Z řady makrobiogenních prvků mají ve vodách zvláštní význam **dusík** a **fosfor**, neboť oproti ostatním prvkům mohou být limitujícím faktorem s negativním dopadem při jejich nedostatku [33]. Ze sloučenin **síry** zasluhují pozornost vedle síranů také toxické sulfidy, příp. z nich okyselením uvolněný sulfan (sirovodík). [33]

Z ekologického hlediska jsou velice významné těžké kovy (**TK**), což jsou prakticky všechny kovové prvky s výjimkou kovů alkalických a alkalických zemin. Některé z nich jsou mikrobiogenní prvky, ve vyšších koncentracích však působí toxicky (Zn, Cu, Cr, Co). Některé nebiogenní prvky mají toxický účinek již při koncentracích velice nízkých (Ag, Hg, Cd, As, Pb), ovšem diferencovaně podle druhu organismu. [33]

K výrazně toxickým látkám, zejména pro vyšší živočichy, patří kyanidy. Do toxických kyanidů patří vedle **HCN** volné ionty CN^- i ionty CN^- vázané jako ligandy v nestabilních komplexních sloučeninách, z nichž se snadno uvolňují. Veškeré kyanidy zahrnují i ty, které jsou vázány v pevných komplexech (např. s $\text{Fe}^{(\text{III})}$ nebo $\text{Fe}^{(\text{II})}$), jejichž toxické působení je proto výrazně nižší. Rozkládají se teprve v silně kyselém prostředí za zvýšené teploty. [33]

K závažným a vodoprávní legislativou limitovaným složkám znečištění patří **radioaktivní** prvky a radioaktivní záření. Eliminování tohoto znečištění vyžaduje zvláštní postupy. [33]

6.2 Způsoby čištění průmyslových odpadních vod

Pro čištění průmyslových odpadních vod se ve shodě s jejich různorodostí používají odlišné způsoby, jejichž vhodnost je závislá na kontaminantu, který je třeba odstranit i na celkovém složení vody a v neposlední řadě i na ekonomii provozu. Ve zkratce jde především o technologie - **mechanické předčištění** (lapáky šterku, česle, lapáky písku, usazovací nádrže sedimentační, vyrovnávací nádrže), **biologické čištění** (aktivace, zkrápěné biofiltry, rotační diskové reaktory, kořenové čističky), **dočištění**. Způsoby čištění průmyslových odpadních vod jsou pak zejména filtrace, ultrafiltrace, membránové procesy, sedimentace, gravitační separátor, flotace, neutralizace, chemické srážení, chemická oxidace a redukce, stripování.

Toto téma je velice rozsáhlé, autor této práce se jemu věnoval při sepisování semestrální práce, která této diplomové práci předcházela, proto téma způsoby čištění OV zde je zcela vynecháno. Pro případný zájem lze doporučit literaturu [9], případně [33].

7 Ověření technologie AnoxKaldnes v praxi

7.1 Základní popis CHBČOV Lučební závody Draslovka Kolín

CHBČOV je kombinovaná chemicko-biologická čistírna projektovaná na likvidaci technologických OV z procesů výroby difenylguanidinu (DPG - urychlovač vulkanizace v gumárenském průmyslu) a výroby acetonkyanhydrinu (AKH - výroba umělých hmot a plexiskla). Produkované denní množství je max. 160 m³/d (doba zdržení OV při maximálním průtoku je 4 dny), což představuje cca 100% produkce OV CHBČOV. OV obsahují kyanidy v koncentracích 100-200 mg/l, anilin (500-1000 mg/l) a DPG (500-800 mg/l). [35], [24]

Odpadní vody z výroby jsou vedeny do neutralizační jednotky, která zároveň vyrovnává kvalitu OV z šaržovité výroby. Výsledná hodnota pH na vstupu do biologických reaktorů je upravována na 6 – 7, s regulovanou hodnotou pH 8 v bioreaktorech. Samotnému biologickému stupni je ještě předraženo fyzikálně-chemické předčištění extrémně znečištěného proudu OV z výroby chlorkyanu (meziprodukt výroby DPG) a egalizační neutralizační stanice. Z technologického hlediska je stupeň předčištění OV z výroby chlorkyanu zajištěn stripováním parou na náplňové koloně. [35], [24]

Bioreaktory

K biologickému rozkladu kyanidů a dominantní části organických látek, zejména anilinu, acetonu, acetonitrilu a částečně i DPG dochází v bioreaktorech. Bioreaktory tvoří dvě kruhové nádrže o vnitřním průměru 8 m a celkové hloubce 5,93 m, užitné hloubce 5,18 m a užitném objemu 2 × 260 m³. Možné je variabilně provozovat paralelní či sériové řazení reaktorů, v závislosti na vývoji technologického procesu. Základní variantou je paralelní provoz bioreaktorů. Nádrže jsou provedeny z vodostavebního síranuvzdorného betonu a vyloženy ochranou folií. Odtok každé z nádrží je osazen odtokovým sítím s automatickým čištěním tlakovým vzduchem. V každé nádrži je umístěna kombinovaná optická kyslíková sonda s teplotní kompenzací a pH sonda. Potřebné množství vzduchu stanoveno pro oba reaktory dohromady je 1930 m³/h. Do každé nádrže je veden nezávislý přívod vzduchu vlastním potrubím. Provoz vzdušňovací systém je tvořen čtyřmi skupinami středněbublinných elementů (kombinované provedení síťovaný polyethylen a nerez materiál), v každé nádrži zajišťující středněbublinnou aeraci. Dvě dmychadla pracují samostatně, každé pro jeden reaktor, a třetí slouží jako automaticky zařazovaná rezerva při poruše jednoho z dmychadel. Otáčky dmychadel jsou řízeny v závislosti na požadované plošné intenzitě aerace a dále na hodnotách rozpuštěného O₂, který je měřen v bioreaktorech. Vyčištěná voda z bioreaktorů je po separaci od biomasy (stržený biofilm a disperzní populace) v dosazovací nádrži a jejím odvodněním na tlakovém filtru (kalolisu) vedena do podnikové kanalizace a následně do recipientu. V době zapracování bioreaktorů je separovaná biomasa recirkulována. [35], [24]

Dekontaminované odpadní vody jsou nejprve vypouštěny do kanalizace průmyslového areálu Lučebních závodů Draslovka a.s. Kolín a po smíšení s ostatními OV následně společně vypouštěny do vodoteče. Recipientem veškerých vypouštěných OV je řeka Labe (levý břeh v říčním km 194,57). Množství OV z ČOV je maximálně 2 l/s (62 780 m³/rok), povolené množství veškerých OV vypouštěných ze závodu je maximálně 200 l/s (900 000 m³/rok). [35]

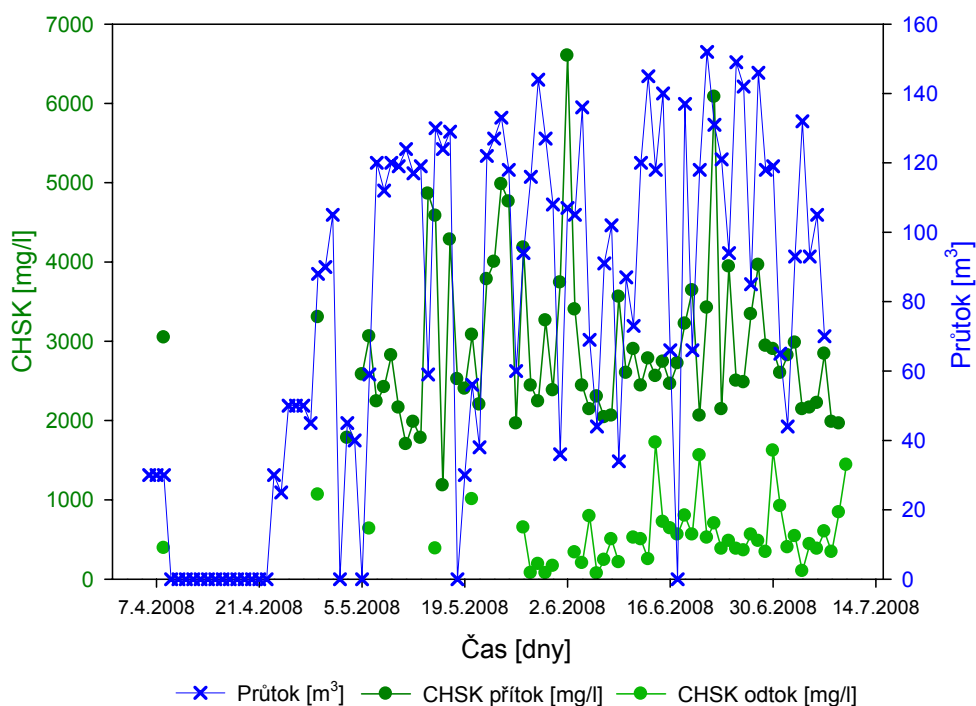
Nosič biomasy

Biomasa narůstá ve formě biofilmové kultury vázané na pevném nosiči, který je v reaktoru neustále v pohybu ve fluidním loži, část biomasy je ve formě disperze v závislosti na době zdržení OV. Podnik jako první v české republice využívá jako nosič biofilmu komerční technologii AnoxKaldnes (třída K3), plnění činí 25 % objemu nádrže (jeho charakteristika je uvedena v kapitole 5.4.1 *Anoxkaldnes™ MBBR*). Procento plnění nosičem vychází ze specifického chráněného povrchu navržené náplně, dostupných objemů bioreaktorů, množství a kvality přiváděných OV a poloprovozně ověřeného látkového zatížení povrchu náplně ($15,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ CHSK), tvořené zejména anilinem. [35], [24]

Inokulace MO

Inokulace byla provedena bakteriální kulturou rodu *Rhodococcus*, který byl cíleně izolován pro danou aplikaci (VŠCHT – ÚKCHB), zejména pro rozklad kyanidů, organických nitrilů a anilinu, se zvýšenou rezistencí k vysoké salinitě. Při úvodní adaptaci MO byl C a N zdrojem technický anilin, dotován byl fosfor ve formě kyseliny fosforečné, která současně sloužila jako neutralizační a tlumící činidlo. Dávkování zdroje dusíku nebylo potřebné vzhledem k vysokému obsahu amonných iontů i dusíkatých organických látek v OV. Později byl přidáván NaCl pro adaptaci na zvýšenou salinitu OV (koncentrace cca 10 g/l). [35], [24]

Koncepce uvedeného technologického řešení vychází z chemického složení OV, laboratorních, pilotních a poloprovozních experimentů biologického čištění OV s obsahem kyanidů, anilinu a DPG, provedených v letech 1998-2006. Průběh odstraňování organického znečištění v rámci zkušebního provozu CHBČOV dokumentuje *Obrázek 16*. Průběh odstraňování CN_{celk} a anilinu pak *Obrázek 17*. [24]



Obrázek 16 - CHBČOV Lučební závody Draslovka Kolín, průběh odstraňování organického znečištění

Základní údaje o vodním recipientu

Krajský úřad Středočeského kraje, OŽPaZ vydal dne 30.11.2006 pod č.j. 138847/2006/KUSK vodoprávní rozhodnutí, které vzhledem k provozu CHBČOV uvádí následující podmínky [35]. Pro vypouštění odpadních vod z výusti CHBČOV do vnitropodnikové kanalizace platí:

- a) množství vypouštěných odpadních vod
 Q_{\max} : 2 l/s 172 m³/den 62 700 m³/rok
- b) množství znečištění v ukazatelích

Ukazatel	Koncentrační hodnoty	
	p [mg/l]	m [mg/l]
CN ⁻ _{celk}	5	10
CHSK _{Cr}	500	800
RAS ²	30 000	35 000
NL ³	15	30
Anilin	50	60
pH		6 – 8,5

(p - přípustné hodnoty koncentrací, m - maximální hodnoty koncentrací) [35]

Tabulka 7 - Denní množství OV a koncentrace kontaminantů z jednotlivých zdrojů [35]

Ukazatel	množství [m ³ /den]	CN _{celk} [mg/l]	CHSK _{Cr} [mg/l]	RAS [mg/l]	N-NH ₄ ⁺ [mg/l]
OV z odstředování suspenze DPG	60	80	7000	45000	300
OV z vývěv ze syntézy DPG a oplachové vody	40	800	2500	1200	10
OV ze syntézy chlorkyanu	30	2500	0	70000	1500
OV z výroby AKH	33	100	850	600	36
Vážený průměr	163	706	3362	29860	396

Tabulka 8 - Parametry nátoky na CHBČOV [35]

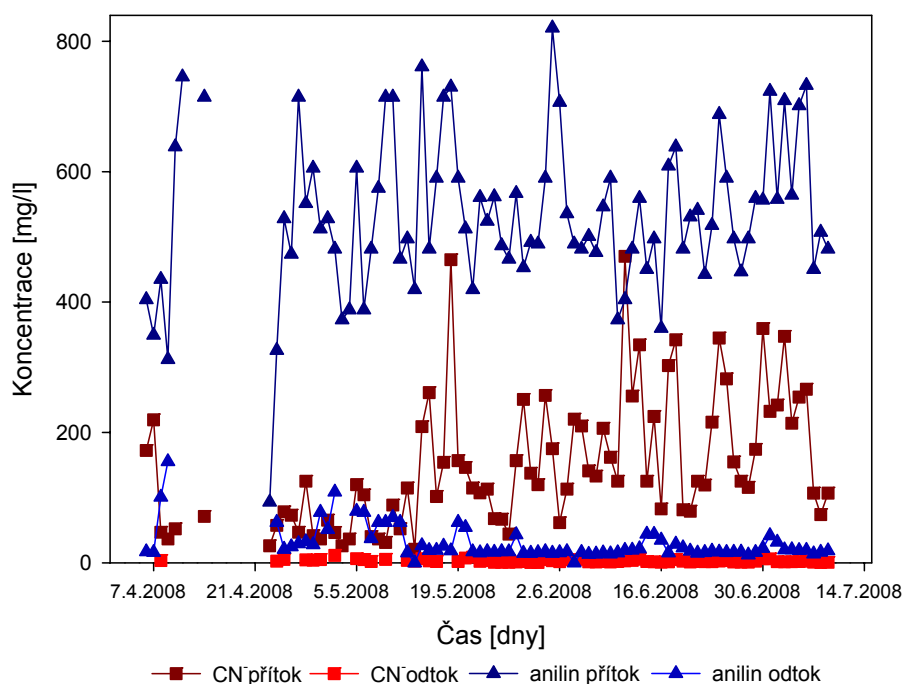
Ukazatel	jedn.	CN _{celk}	CHSK _{Cr}	NL	Anilin	RAS
Průměrná koncentrace	[mg/l]	685	3200	40	1 115	28 400
Prům. bilanční množství	[kg/den]	118	550	7,2	192	4 885

Tabulka 9 - Předpokládaná kvalita odtoku z CHBČOV (po zpracování biologického stupně) [35]

Ukazatel	jedn.	CN _{celk}	CHSK _{Cr}	NL	Anilin	RAS
Průměrná koncentrace	[mg/l]	5	500	15	25	28 635
Maximální koncentrace	[mg/l]	10	800	25	50	28 670
Prům. bilanční množství	[kg/den]	0,9	86	2,6	4,3	5 200
Max. bilanční množství	[kg/den]	1,7	138	4,3	8,6	5 250

² RAS – rozpuštěné anorganické soli

³ NL – nerozpuštěné látky



Obrázek 17 - Průběh odstraňování CNcelk a anilinu na přítoku a odtoku CHBČOV

Rozptyl hodnot naznačený na *Obrázek 17* je evidentně velice proměnlivý a dokládá rozkolísanost činnosti CHBČOV (zejména při jejím úvodním zapracování), která je způsobena především nevyrovnaností kvality přiváděných OV, jenž je závislá na aktuální technologické lince. V mimořádných případech ve výrobě je nutno měnit průtok OV podle aktuálního stavu jednotlivých znečišťujících látek. Například při vysoké koncentraci kontaminantů v OV je nutné snížit průtok, a naopak. V technologické lince se také vyskytují procesy, které způsobují navýšení hodnot odtokové CHSK. Jedná se o nerozložitelné meziprodukty z výroby (prozatím neidentifikované zbytkové organické látky).

Tabulka 10 - Hodnoty stanovené ve směsných vzorcích na odtoku z BČOV [35]

Stanovení	Hodnota [mg/l]	
	Min	Max
CHSK _{Cr}	384	1064
Anilin	0	155
CN ⁻ _{celk}	2,3	11,5
CN _{tox.}	1,5	6
N-NH ₄	322	509
pH	7,6	8,2

7.2 Hlavní kontaminace

7.2.1 Kyanidy

Kyanidy (CN_{celk}) jsou nebezpečné závadné látky (zejména pro aerobní organismy, ryby a vodní organismy), náležící do skupiny anorganických sloučenin. Do toxických kyanidů patří vedle HCN volné ionty CN^- . Veškeré kyanidy zahrnují i ty, které jsou vázány v pevných komplexech (např. s $\text{Fe}^{(\text{III})}$ nebo $\text{Fe}^{(\text{II})}$), jejichž toxické působení je tak výrazně nižší, rozkládají se teprve v silně kyselém prostředí za zvýšené teploty, což je velice nebezpečná situace, neboť při nízkém pH dochází k vývinu a úniku prudce jedovatého plynu kyanovodíku. [36]

Jsou rozpustné ve vodě i v alkoholu. Ve styku s vodou mohou mít zápach po kyanovodíku (mandlový) i po amoniaku (štiplavý). Když se dostanou do půdy, nevázají se na částice a mohou se vyluhovat do podzemních vod, ale ani tam nejsou stálé. Jejich bioakumulace ve vodních organismech je nepravděpodobná, ale jako jedy narušující vázání kyslíku dýchacími enzymy. Z vody a z půdy se mohou rychle odpařovat do ovzduší. Dobře podléhají mikrobiologickému rozkladu. Stárnutím se toxicita těchto solí snižuje někdy i na polovinu, protože vlivem vzdušného oxidu uhličitého se kyanid mění na netoxický uhličitán. [33], [36]

Kyanidy jsou používány v metalurgii, chemickém a fotografickém průmyslu a při výrobě plastu (nylon). Dále je můžeme čekat při výrobě pryží, výbušnin a vykuřovacích prostředků. Kyanid sodný a draselný jsou důležité prostředky při elektrochemickém pokovování a tvrzení oceli, k povrchové a tepelné úpravě kovů a jejich odmašťování, tepelného zpracování uhlí a výroby karbidu vápenatého. Mohou být používány i pro extrakci zlata a stříbra z minerálů v těžebním průmyslu. Soli kyanidů se vyskytují v galvanizovnách při použití kyanidových lázní k pokovování (zlacení, stříbření, mědění), při extrakci zlata a stříbra z rud, v laboratořích. Technologicky je výhodné, že tyto sloučeniny s drahými kovy jsou dobře rozpustné ve vodě. [36]

Pro snížení jejich znečištění v odpadních vodách je vhodné využít následujících technických postupů. Použití třístupňového postupu čištění odpadních vod v čistírně odpadních vod (moderní fyzikální separace, včetně číření a flotace) a biologického čištění. Zavedením biologického stupně nitrifikace/denitrifikace. Zajistit, aby byla čistírna odpadních vod navržena tak, aby měla dostatečnou kapacitu pro zábrany proniknutí nárazových koncentrací toxických látek do biologického stupně čištění odpadních vod, např. zařazením vyrovnávacích nádrží, bočných zachytných tanků, předimenzováním reaktoru, atd. [36]

7.2.2 Anilin

Anilin je závadná látka, náležící do skupiny aromatických uhlovodíků a má vysoký toxický potenciál na životní i vodní prostředí. Akutní toxicita je především pro ryby a vodní organismy, ale také pro bakterie. Prokázán byl i omezený důkaz mutagenních a karcinogenních účinků. Anilin je bezbarvá olejovitá kapalina, na vzduchu snadno oxidující a barvící se na žlutou až hnědou barvu. Za normálních podmínek je anilin stabilní. Podmínky, kterých je nutno se vyvarovat jsou teploty vyšší než $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, neboť anilin má vysokou tenzi par. Páry jsou toxické, v uzavřených objektech je dokonce možný vznik výbušné směsi se vzduchem. Reaguje prudce se silnými oxidačními

činidly a anorganickými kyselinami. S alkalickými kovy a kovy alkalických zemin reaguje za vzniku hořlavého plynu. Rozpouští měď a její slitiny. Nesmí přijít do styku s poživatinami. Při hoření se může uvolňovat toxický oxid uhelnatý a oxidy dusíku. [36]

V přírodě se nachází v černouhelném dehtu, průmyslově se vyrábí redukcí nitrobenzenu. Do životního prostředí se tak nejčastěji dostává z odpadních vod. Je omezeně rozpustný ve vodě, perzistentní a velmi dobře rozložitelný. Používá se při výrobě barviv a léčiv. V současnosti má tato látka největší využití jako reakční komponenta k průmyslovému zpracování při výrobě polyuretanů, barvářských meziproduktů, léčiv, urychlovačů pro syntetický kaučuk a pro výrobu jiných organických sloučenin a v chemickém průmyslu. [36]

7.2.3 DPG

Velice pravděpodobný výskyt v průmyslových odpadních vodách z gumárenského průmyslu je difenylguanidin, patřící do skupiny látek označovaných jako guanidiny. V širším slova smyslu patří DPG do skupiny gumárenských chemikálií, užívaných při výrobě především průmyslové pryže jako urychlovač vulkanizace (technický akcelerator). Ke stejnému účelu se používá také jeho derivát - ftalát difenylguanidinu (Guantal). Tyto látky mohou obsahovat kolem 5 % balastních chemických sloučenin příbuzných nebo i jiných nečistot (urychlovače z řady thiazolů nebo sulfenamidů), takže při řešení přecitlivělosti na pryž je nutné postupovat velmi obezřetně. [36]

DPG je velice málo rozpustný, proto i pomalu rozložitelný, často se tak v OV vyskytuje nedosrážený a jako takový způsobuje zvýšené koncentrace CHSK na odtoku (1g DPG představuje minimálně 2 g CHSK). DPG se používá především při výrobě průmyslové pryže (nikoliv pryžových výrobků denní potřeby, výjimku tvoří materiály na které jsou kladeny zvlášť vysoké požadavky na kvalitu). Příkladem jsou gumové a latexové rukavice, koupací a potápěčské pryžové výrobky (neoprén), obuv, pneumatiky, dopravníkové pásy, těsnění aj. [36]

Tabulka 11 - Přehled základních vlastností hlavních polutantů OV na CHBČOV Draslovka [36]

systematický název		kyanidy	phenylamin, aminobenzol	1,3- difenylguanid in (DPG)
triviální název		cyankáli	anilin	melaniline
funkční vzorec		CN ⁻ kyanidový aniont, (NaCN)	C ₆ H ₅ NH ₂	C ₁₃ H ₁₃ N ₃
skupina látek		sodná sůl kyseliny kyanovodíkové	aromatické uhlovodíky	guanidiny
vzhled		bílá, krystalická, hygroskopická látká	bezbarvá olejovitá kapalina, na vzduchu hnědne	bílý až slabě našedlý prášek
zápach		hořkých mandlí	charakteristický aromatický	bez zápachu
pH (při 20 °C)		11 - 12	-	silně alkalická
skupenství (při 20 °C)		pevné	kapalné	
molární hmotnost	[g/mol]	26,018 (KCN - 65,116)	93,128	211,27
teplota tání	[°C]	(634)	-5,98	146
teplota varu	[°C]	(1625)	184,4	170
hustota	[kg.m-3]	(1560)	1022	1190
rozpustnost ve vodě (při 20 °C)	[g.l-1]	(237)	34	0,56
CHSK	[mg.g-1]	-	2365	2038
BSK ₅	[mg.g-1]	-	1600	150
toxická		pro ryby i ostatní vodní organismy	pro vodní organismy	pro vodní organismy

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8 Degradace cizorodých látek v reálné odpadní vodě

Diplomová práce navazuje na praktické ověření průmyslového čištění odpadních vod za použití komerční technologie AnoxKaldnes™ MBBR probíhající v podniku Lučební závody Draslovka a.s. Kolín (v České republice první podnik s tímto typem technologie, popis nosiče AnoxKaldnes lze nalézt v kapitole 5.4.1). Základem práce je reprodukovat dané podmínky plnoprovozní aplikace (technologické parametry biologické čistírny podniku, druh degradujícího mikroorganismu, sestavení systému a mnoho dalšího). Dále tyto podmínky vhodně realizovat v laboratorních experimentech a určit možné limitní stavy pro tuto čistírnu (např. minimální doba zdržení, maximální teplota), a to při zachování efektivnosti celého procesu.

Primárním cílem je vývoj nového typu nosiče, což by mělo optimalizovat stávající metody čištění OV. K tomuto se využívá polymerních nanovlákných nosičů, které se v poslední době velice zdařile projevují v široké škále lidských činností. Tento moderní přístup kombinace nanovlákných struktur a biotechnologie, či mikrobiologie, který skýtá mnohé příležitosti, je z obecného pohledu lehce nastíněn v kapitole 3 pod názvem *Nanobiotechnologie*. Na tomto principu, tedy spojení nanotechnologie a biotechnologie, je sestaven i tento druhý zcela původní systém. Obecné pojednání této technologie lze nalézt v kapitole 5.5 *Vlákněné polypropylenové, polyuretanové nosiče („BA“)*. Největší předností moderního nosiče je nanovlákná podložní matrice, která má zásadní úlohu, plní funkci primární vrstvy, která bakteriím umožňuje daleko vyšší adhezi k povrchu, na rozdíl od jiných materiálů (tzv. „tvrdé nosiče“, např. Anox-Kaldnes), kde musejí bakterie nejprve narušovat povrch, předtím než jej začnou kolonizovat. Tyto závěry potvrzují poslední výsledky z experimentálních zkoušek a mikroskopické sledování nosiče v průběhu úvodního narůstání biofilmu. U nanovlákných struktur je tedy výhodnější základní nosný povrch, který umožňuje daleko rychlejší zapracování nosiče. Samozřejmě nejde jen o úvodní kolonizaci nepoužitého nosiče, ale také o jeho revitalizaci v průběhu činnosti systému, například při extrémních nárazových stavech (například nečekaný výkyv teploty či průtoku), což není v reálné praxi ničím neočekávatelným.

8.1 Hlavní myšlenka laboratorního ověřování

Cílem laboratorního ověření průmyslové praxe na CHBČOV Draslovka Kolín spočívá především v ověření možných hraničních podmínek a limitů technologických parametrů čistírny. Zejména se jedná o ty, které by mohly negativně ovlivňovat a narušovat chod čištění na CHBČOV s dlouhodobými následky (rozkolísanost přítokové vody, jak z hlediska objemu, tak dle obsahu toxických látek, velké rozdíly v letních a zimních teplotách). Odpadní vody obsahují kontaminaci vysoce toxických průmyslových látek (především anilin, kyanidy a DPG, obecně může jít o jakékoli chemické zatížení, na které mohou být mikroorganismy adaptovány). Základním požadavkem na toto znečištění je jeho biologická rozložitelnost. V této práci se užívá mikroorganismu (MO) rodu *Rhodococcus* (reprodukce podmínek CHBČOV), který se velice dobře adaptuje na výše zmíněnou chemickou zátěž a fyziologické podmínky. Navíc je tento MO schopen vytvářet přirozený biofilm, což mu umožňuje daleko vyšší resistenci k daným

polutantům. V bioreaktoru se tak tvoří přirozená populace MO (dispergovaná v suspenzi a vázaná na nosič). Systém je testován z hlediska několika základních požadavků, která se mohou v praxi reálně vyskytovat. Jedná se především o vliv teploty, salinity a doby zdržení na stav bakteriální populace v systému a její schopnosti eliminovat nežádoucí látky v OV. Systém tak prochází zátěžovými stavy, u nichž je ověřována odezva systému (zda se MO dokáží přizpůsobit daným podmínkám). Hodnocení účinnosti degradace je prováděno na základě hodnot CHSK, sledování změny růstu populace MO v médiu probíhá měřením turbidity, případně stanovením biomasy na nosiči. Dalším cílem je optimalizace technologie, resp. vývoj alternativního nosiče biomasy, pro snížení finanční náročnosti. Jedná se o tuzemskou výrobu unikátní technologií vedoucí minimálně ke snížení nákladů na přepravu. Výhodou je také možné zvýšení účinnosti čištění, v důsledku vysokého chráněného specifického povrchu, což umožňuje rychlejší zpracování nosiče.

Pro modelové ověření vyvíjené technologie byl zvolen reálný případ čištění OV z výroby difenylguanidinu (DPG) produkovaných v Lučebních závodech Draslovka a.s. Kolín. Důvody této volby byly následující. Na lokalitě producenta OV probíhá v současné době zkušební provoz chemickobiologické čistírny odpadních vod (CHBČOV) využívající přirozeně upoutanou biomasu na nosiči ve vzhledu. Jako nosič biomasy je použit komerčně dostupný produkt. Reálná odpadní voda představuje případ extrémní specifické kontaminace organickými i anorganickými látkami, vysoké salinity a změn teplot v průběhu roku. Optimalizace a ověřování této technologie vyžaduje modelové řešení různých provozních situací a zjišťování limitů pro jednotlivé technologické parametry. Tyto experimenty probíhají v laboratořích TUL. Vývojový program optimalizace provozované CHBČOV tak nabízí možnost přímého paralelního testování komerčně dostupného typu nosiče a nově vyvíjeného systému, a to v širokém rozsahu rozhodných technologických parametrů (doba zdržení OV, teplota, salinita). Cílem takové verifikace je pak potvrzení vhodnosti vyvíjeného nosiče (stabilita, kolonizovatelnost, schopnost regenerace) v širokém rozmezí technologických parametrů a s reálnými odpadními vodami. [24]

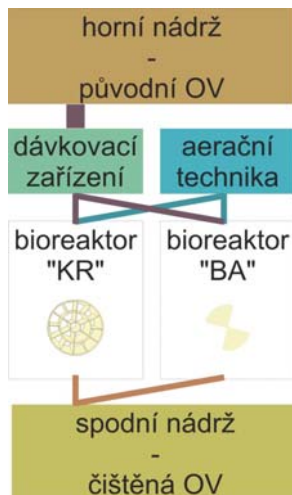
8.2 Skladba laboratorního modelu

Veškeré experimentální činnosti v této práci jsou realizovány v tzv. bioreaktoru, detailnější popis technologie je popsán v kapitole 4.2.3.4 *Bioreaktory*. Celé seskupení všech elementů nutných pro správný chod reaktoru je označen jako tzv. **systém**, jde tedy o předem danou kompozici jednotlivých zařízení, které jsou koncipovány tak, že dohromady představují ucelenou správně fungující soustavu. Celý systém je tak tvořen následujícími prvky.

Samotné **bioreaktory** jsou tvořeny tří-litrovou skleněnou nádobou (standardní širokohrdlá kádinka), s odtokem na objemu dva litry, které jsou umístěny ve větrané digestoři (pro případný odvod vznikajících plynů). Zde dochází k promíchávání kontaminované vody a biodegradujících mikroorganismů. Zásadní podmínkou je udržet mikrobiální biomasu v systému, k čemuž se využívá daných nosičů. Výhodou reaktoru je, že celý biodegradační postup lze velmi dobře kontrolovat, k čemuž se využívá měřících sond. Pravidelně je kontrolováno především CHSK, koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH, teplota, průtok, dále pak také vodivost, ORP, biomasa, koncentrace substrátu.

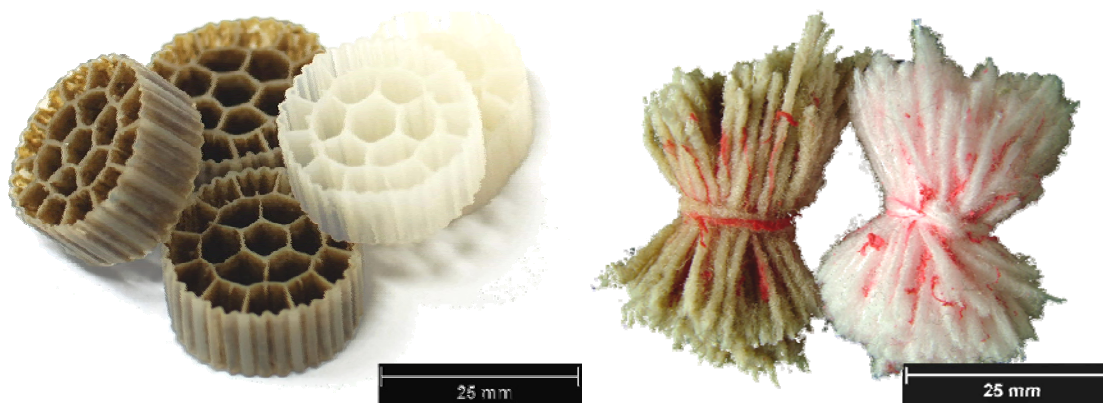
Přitékající znečištěná **odpadní voda** se uchovává v přítokové nádrži umístěné v digestoři (pro případ vytěkávání CN⁻). **Přítok** této vody do reaktoru je realizován

peristaltickými průtokovými čerpadly. Ve vodě se nachází dané polutanty (anilin, CN^- , DPG), ovšem další nezbytné nutrienty (především fosforečnany) přítomné nejsou. **Živiny** mohou být dodávány přímo do zásobníku s odpadní vodou. Nutno je však věnovat pozornost, aby jejich koncentrace ve směsi byla udržována na dostatečné hodnotě (zdroj pro růst MO). Jejich případný nedostatek či nadbytek může působit inhibičně.



Obrázek 18 – Blokové schéma systému v laboratoři

V každém bioreaktoru se nachází **bakteriální populace** (kmen *Rhodococcus*), který je jednak volně dispergovaný v suspenzi, a také vázaný na nosič. Jedná se o MO aerobní, proto ke svému metabolickému pochodu potřebují přísun kyslíku. Tento je do systému přiváděn provzdušňovacím zařízením (viz. dále). K tomu aby MO mohly efektivně degradovat polutant je třeba je v reaktoru rovnoměrně rozmíchávat, aby se neustále dostávaly k potřebným látkám. K tomu slouží míchací zařízení, v tomto případně však dostatečně postačí samotné (středně-bublinné) aerační zařízení, díky němuž vzduch dokáže v médiu cirkulovat a dostatečně tak nosiče promíchávat.



Obrázek 19 - PE nosič AnoxKaldnes s/bez biofilmu, „Nanobambule“ s/bez biofilmu

V suspenzní populaci jsou promíchávány dané **nosiče biomasy**, které postupem času obrůstají bakteriální populací. Jeden bioreaktor je tvořen standardními plastovými nosiči AnoxKaldnes, ve tvaru „kroužků“ (označení KR, *Obrázek 19*). Druhý reaktor je tvořen nově vyvíjenými nosiči. Při této práci byl experimentálně vyvinut nanovláknový nosič sférického tvaru, pokryt nesouvislou vrstvou nanovláknů, tzv. „nanobambule“ (označení BA, *Obrázek 19*), neboť tento tvar poskytuje nejvyšší možný styčný povrch nosiče s odpadní vodou. Také jeho výroba je celkem nenáročná. Nosiče byly do

reaktorů vloženy tak, aby činily 30 % jeho plnění (700 ml sypný objem nosiče), což odpovídá reálnému nasazení v provozu CHBCOV.

Zmíněný **provzdušňovací systém** je nezbytný pro efektivnější přísun kyslíku do média (platí tedy jen pro aerobní MO). Vzduch je přiváděn aeračními pumpami, které jsou napojeny na silikonové hadičky, a ty poté na kruhové středněbublinné elementy umístěné u dna nádoby, díky nimž se do reaktoru dostává taková koncentrace kyslíku, která je dostatečná i na míchání nosičů (využití rozpuštěného O₂ je 2 - 3 %, na metr vodního sloupce, s dostatečným promícháváním nosičů). Kyslík je do systému přiváděn v nadbytku, což růst MO nijak neomezuje, pokud však do systému bude kyslík dodáván nedostatečně, dojde k okamžitému odumírání MO a jejich následnému vyplavování ze systému. Na biofilmu dochází k odpadávání vázané populace a rozpadávání vloček.

Při kultivaci se může uvolňovat teplo, proto je vhodné reaktor chladit. Teplotní skoky mohou na MO působit inhibičně, proto jsou reaktory uchovávány při konstantní teplotě v klimatizované místnosti. V etapě, kdy je zapotřebí udržovat vyšší/nížší teplotu se využívá **zahřívací či chladicí zařízení**. Nižší teploty byly simulovány v zimním období, proto chladicí zařízení nebylo nutné. Při vyšších teplotách byla nasazena vodní lázeň. Důležitým hlediskem, zejména při vyšších teplotách je, aby byl systém umístěn v dokonale větrné místnosti, nejlépe v digestoři, neboť může docházet k vytékávání kontaminantů z reaktoru. Především jde o kyanidy a anilin.

Odtok je realizován volným přepadem, který zachovává konstantní objem v bioreaktoru na hodnotě dva litry, případný další objem odtéká společně s některými MO dispergovanými v suspenzi do **odtokové nádrže** (využívá se výškového spádu). Nádrž je na reaktor napojena silikonovými hadičkami, stejně jako v celém systému.

8.3 Prvotní testy

Před samotným spuštěním biologického systému, je nutné provést řadu úvodních experimentů, které stanoví technické parametry soustavy. Jedná o řadu inženýrských výpočtů, které se obecně provádí při návrhu čistíren odpadních vod. Hlavním důvodem je určení optimálních požadavků na biologické procesy, aby se dařilo udržovat jejich funkci a proces byl dostatečně efektivní. Získané parametry jsou nutnou podmínkou zajištění dobré funkčnosti reaktorů. Parametry závisí na vstupech i výstupech jednotlivých nádrží, také na jejich vzájemné provázanosti. Navrhnout a provést sérii těchto experimentů, pro stanovení technologických parametrů aeračního systému, bylo podstatou diplomové práce Miloše Rejmana „*Určení technologických parametrů fluidního bioreaktoru s využitím „nanobambulí“ jako nosiče biomasy*“. [37]

Smyslem práce bylo hodnocení účinnosti aerace vyjádřené oxygenační kapacitou, respirační rychlostí vyjadřující spotřebu kyslíku (potřebná aerace z biologického hlediska), hydraulickými charakteristikami nádrže (aerace z hlediska hydraulických kritérií), distribucí a chováním nosičů v důsledku aerace a paralelním testováním jejich vlastností s již komerčně dostupnými plastovými nosiči biofilmu AnoxKaldnes. V závěru práce měl být stanoven vliv nanovláknenného nosiče na oxygenační kapacitu, který ovšem nebyl prokázán. Doporučený stupeň plnění byl vymezen v rozmezí 25 % až 30 % (základ s možností navýšení při intenzifikování biologických procesů). Doporučené množství zpracovaných „nanobambulí“ potřebné na jednotku objemu bylo nalezeno v počtu 14-17 ks/l. [37] Práce byla základem pro navazující biologickou část.

8.4 Princip provozu modelů

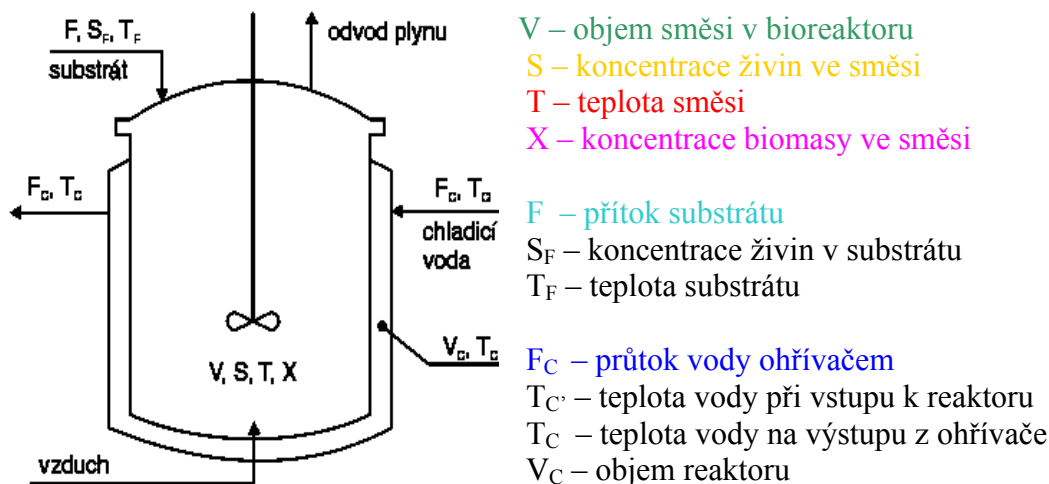
Systém je provozován na principu kontinuální kultivace (reálněji odpovídá podmínkám v praxi). Experimentální studie začíná jako vsádkový test, inokulací média (bakterií rodu *Rhodococcus* - zvolen v důsledku reálné aplikace v podniku Lučební závody Draslovka a.s. Kolín) do dvou paralelních modelů bioreaktorů s nosičem biomasy ve fluidním loži. Bakteriální suspenze byla odebrána z CHBČOV Draslovka Kolín (pro tento podnik byl původně adaptován na VŠCHT – ÚKCHB) a dále v laboratorních podmínkách adaptována za vhodných podmínek na daný kontaminant. První tři týdny je suspenze přizívována pouze anilínem (1 g anilinu = 2 g CHSK, dávkováno bylo zpočátku 0,5 g anilinu na 1 l suspenze, tedy 1000 mg/l CHSK). Koncentrace anilinu je v průběhu vsádkového testu pozvolna navyšována (vždy když došlo k jeho odbourání, dle hodnot CHSK), aby se daný MO mohl dostatečně adaptovat na následující provozní podmínky s reálnou odpadní vodou (MO se rychleji rozmnožují a také zvyšují svůj objem). Dodávána je také kyselina fosforečná (dostatečně ředěná), neboť v médiu je velký deficit živin.

Ve daném okamžiku je vhodné začít s řízeným dávkováním substrátu (odpadní voda pocházející přímo z průmyslové výroby) tak, aby se udržel optimální růst MO. Bakteriální kultura se v tomto uspořádání již nepřivádí. S přítokem je obecně vhodné začít v exponenciální fázi růstu, kdy je kultura nejaktivnější. Na tuto etapu lze usuzovat z nízkých hodnot CHSK a rostoucích hodnot optické density. Průtok kontaminantu bývá zprvu velice nízký (doba zdržení 10 dnů), zejména z důvodu nových podmínek na které je nutno organismus adaptovat (především na obsah CN^- a vysokou koncentraci soli). V průběhu další adaptace se hodnota průtoku zvyšuje (až k době zdržení 2 dny).

8.5 Ideální proces adaptace mikroorganismů

Každý chemický proces probíhá dle podmínek prostředí v němž se vyskytuje. Prostor však může být natolik složitý systém, že v závěru experimentů není možné jednoznačně určit, který vliv prostředí (či dalších působení) je dominantní. Z tohoto důvodu se volí jednodušší provedení testů. A to buď v laboratoři, nebo je možné využít modelového ověření (počítačové simulace). V laboratorním experimentu nebylo možné proces dále zjednodušit, proto je zde vhodné využít moderního způsobu hodnocení degradability, a to za využití matematického modelu. Posuzování chování procesů pomocí počítačových simulací je zvláště ekonomické (finančně i časově) a bezrizikové.

Jako příklad je zde uveden matematický model biotechnologického procesu, vsádkový test v bioreaktoru. V reaktoru jsou udržovány organismy, k nimž je přiváděn substrát. Systém se je uchováván za konstantní teploty, pouze za zvýšené teploty bude ochlazován.



Obrázek 20 - Schéma bioreaktoru [38]

Jak je vidět na následujícím *Obrázek 21*, již během několika málo hodin dojde k radikálnímu poklesu obsahu živin ve směsi (a), v této době je vhodné spustit přítok substrátu do reaktoru (c), MO mají totiž největší aktivitu a tak i velkou snahu přijímat živiny (případně degradovat kontaminaci). Koncentrace biomasy ve směsi (a) tak rychle roste, MO se množí a vyvíjí teplo. Teplota směsi tak roste (b), proto je vhodné nyní zapojit chladicí zařízení (b). Jelikož se do reaktoru přivádí substrát se živinami a zároveň dochází k množení MO, dochází tak k nárůstu celkového objemu kultivační směsi. Bezodtokový reaktor je tak nutno kontrolovat. Na konci simulovaného experimentu byl zastaven přítok substrátu, a dochází tak ke stagnaci koncentrace biomasy v důsledku vyčerpání živin ze substrátu. MO se již nemnoží, pouze zůstávají ve směsi, v téměř neměnném stavu. Teplota směsi se z důvodu neaktivity MO snižuje. Celkový objem směsi se dále již nemění.



Obrázek 21 – Ideální průběh kultivace směsi v bioreaktoru [38]

V závěru matematického modelování je vhodné provést ověření adekvátnosti modelu, tedy souhlas modelovaných průběhů s realitou. Zjišťujeme, jestli při určitých změnách vstupních veličin se výstupy chovají podle očekávání a podle logiky věci. [38] Pro ohodnocení správnosti modelu je vhodné mít podrobnější experimentální data a porovnávat časové průběhy naměřené a vypočtené.

8.6 Reálný průběh adaptace mikroorganismů

Tyto průběhy jsou ovšem zcela idealizované, neboť je zde celá řada vlivů, které jsou naprosto zanedbány. Například **skladba přiváděného substrátu**. Zde jsou přítomny pouze živiny, ale v případně reálných průmyslových OV je přítomna celá řada dalších látek, které mohou na MO působit inhibičně. **Průtok substrátu** je také idealizován. V reálné praxi nikdy nedochází ke konstantnímu průtoku směsi do reaktoru (viz. *Obrázek 16*, strana 44). V laboratorní praxi zase musíme uvážit nespolehlivost čerpacího zařízení. Dokonce ani **objem kultivační směsi** se v reálu takto nechová, neboť dochází k odpařování vody ze systému (zejména za vyšších teplot) a může docházet například k zasolování substrátu, což je pro MO také velice toxický efekt. Dozajista zde působí mnoho dalších vlivů, které ještě ani nemusely být prozkoumány.

9 Průběh degradačních procesů (laboratorní zkoušky)

V přirozeném prostředí je růst a metabolická aktivita mikrobiálních degradátorů do značné míry ovlivněna celou řadou vnějších faktorů (fyzikálních, chemických, biologických). Samotné prostředí, v němž se degradace uskutečňuje, je v důsledku dynamiky probíhajících transformačních procesů vysoce variabilní, což zpětně ovlivňuje jak samotnou rychlost transformace polutantů, tak i mikrobiální dostupnost vznikajících produktů či jejich perzistenci. [18] Lze tedy říci, že přirozené prostředí má nemalý vliv na úspěšný průběh degradace polutantů.

Ověřovaný biotechnologický proces je založen především na biodegradaci kontaminantů, kde hlavními složkami jsou anilin, kyanidy a DPG. Souhrnně jsou charakterizovány hodnotou CHSK (znázorněna v každém z uvedených grafů na levé y-ové ose), která je určena aktuálně odebranou kontaminovanou vodou z provozu CHBČOV. Průměrná hodnota přitékající vody do modelů byla 3500 mg/l CHSK. Na odtoku z modelů se nacházejí polutanty ve zcela minimálním množství, celkové kyanidy klesají průměrně z hodnoty 150 mg/l na 3,0 mg/l, anilin z hodnoty 540 mg/l na 170 µg/l, CHSK z hodnoty 3500 mg/l na 300 mg/l (hodnoty byly stanoveny na CHBČOV). Laboratorní experimenty, které probíhají od února roku 2008, jsou prováděny ve směšovacích reaktorech s nosičem biomasy a s reálnou průmyslovou OV. [24]

Růst mikroorganismů (MO) probíhá v závislosti na vnějších podmínkách, pochod transformace cizorodých látek je tak vhodné doplnit fyzikálně-chemickým měřením. Například míra znečištění kontaminované OV vyjádřená jako CHSK (případně BSK, či koncentrace CN^- , anilinu), rychlost jejího přivádění a s tím související látkové zatížení, teplota, hodnoty pH, ORP, obsahu solí (vodivost), rozpuštěný kyslík O_2 , obsah nerozpuštěných látek aj. Výhodou u ex-situ biodegradace je lepší kontrolovatelnost těchto parametrů. [15]. Limitujícími faktory jsou zde především vyčerpání substrátu (pokles CHSK) a živin (zejména fosfor, fosforečnany jsou přidávány do OV v koncentraci cca 20 mg/l). Chemické analýzy zahrnují měření makro i mikronutrientů například fosforečnanů, draslíku, hořčíku, vápníku, železa a síranů (koncentrace amonných iontů jsou v důsledku degradace dusíkatých látek extrémně vysoké). [24]

V rámci sledování procesu degradace je nutné monitorovat i tzv. abiotické úbytky kontaminantů (sorpce na nosič či vytékání), které jsou dány fyzikálně-chemickými vlastnostmi kontaminantů a typem použité dekontaminační technologie. Adsorpce může být z hlediska biodegradace výhodná, ale na druhou stranu může biodegradační proces limitovat. Svou roli může hrát například i degradace samotného nosiče (možnost nechtěného uvolňování povrchových vrstev materiálu, případně nanovláken). Vynechání abiotických vlivů často způsobuje velice zkreslené výsledky metod.

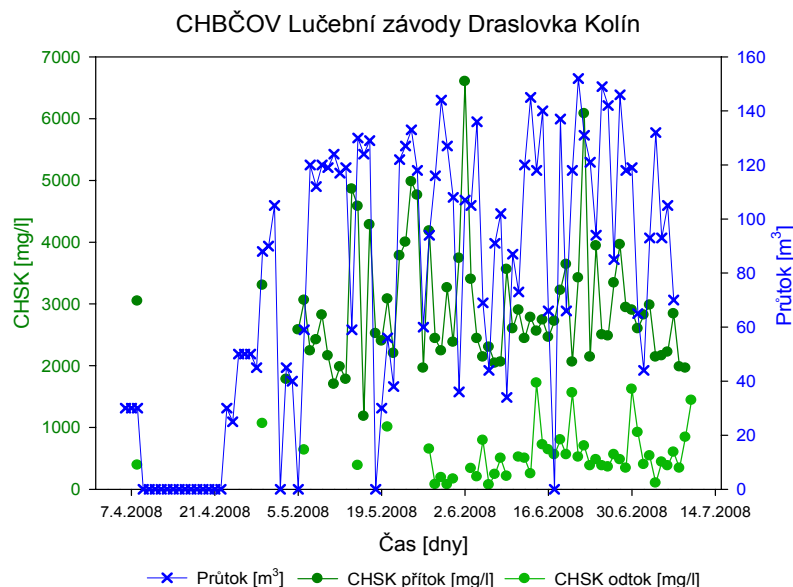
U následujících grafů platí vždy toto označení:

- KR – komerční polyetylenové nosiče AnoxKaldnes
- BA – moderní polypropylenové nanovláknenné nosiče (TUL)

9.1 Doba zdržení

Hlavním parametrem charakterizujícím kontinuální kultivaci je přítok substrátu, (m^3/den – pro velkoobjemové nádrže v průmyslové praxi, ml/den – pro laboratorní experimenty). Substrát obsahuje především látky určené k degradaci (polutantů). Jelikož se jedná o OV z technologické linky, je obsah dalších nezbytných nutrientů pro degradaci (za využití mikroorganismů) velice minimální. Je tedy vhodné do OV přidávat alespoň primární látky nepostradatelné pro MO, jako například fosfor a dusík. Více informací k tématu nutrienty v OV lze nalézt v kapitole 9.5 *Živiny*.

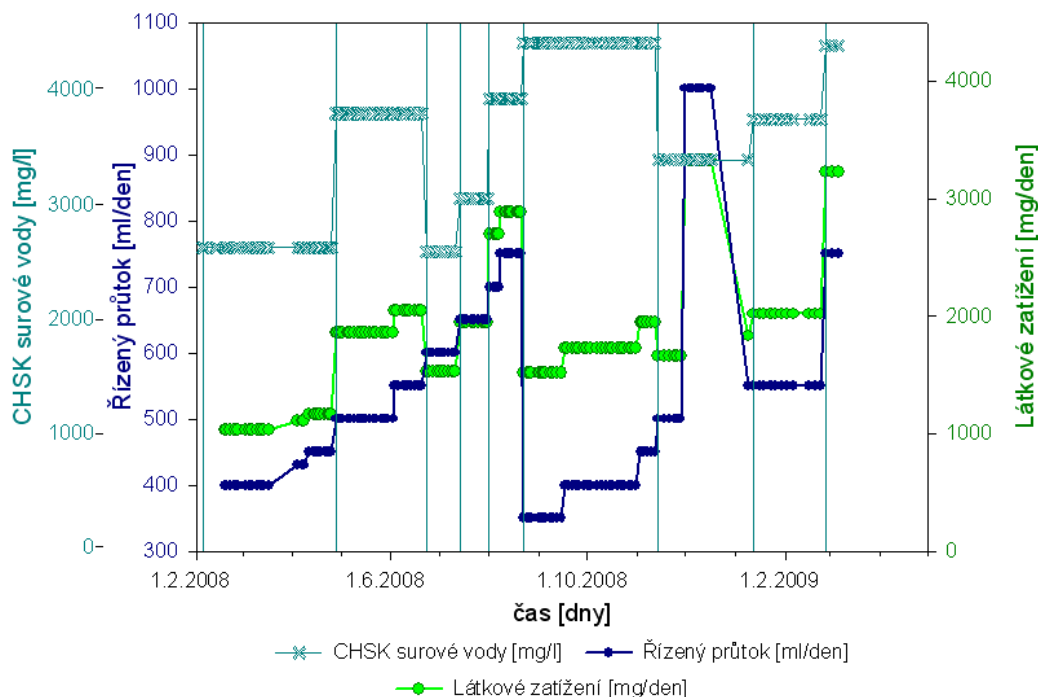
V průmyslové praxi je OV do reaktoru přiváděna zcela nerovnoměrně a její vývoj nelze nikterak předpovídat. Přítok je dán aktuálním zatížením a potřeb podniku. Rozkolísanost procesu CHBČOV (hodnot průtoku a koncentrace organického znečištění) je naznačený na *Obrázek 22* (převzat z kapitoly 7.1 *Základní popis CHBČOV Lučební závody Draslovka Kolín*). V laboratorním experimentu lze tento nerovnoměrný přítok OV také simulovat, ale pro tuto práci byl zvolen přístup řízeného průtoku, a to z důvodu ověření limitních stavů komerčně dostupné technologie (provozně možná maxima v reálné praxi CHBČOV).



Obrázek 22 - CHBČOV, průběh odstraňování organického znečištění

Dalším možným vyjádřením přítoku OV, je doba zdržení. Udává čas, za který se vymění celý objem směsi v reaktoru, nejčastěji je vyjadřována v jednotkách [dny]. Následně je tak možné porovnávat velkoobjemové reaktory s laboratorními (převrácená hodnota je zředovací rychlost [čas^{-1}]). Pokud bude zředovací rychlost příliš vysoká, obsah biomasy v reaktoru bude klesat (nízká doba zdržení, reaktor se vyplavuje), možný je také toxický efekt velkého množství přetékající OV. Příliš malá zředovací rychlost má za následek nedostatek živin v kultuře, růst MO se tak zpomaluje. Při idealizovaném konstantním přítoku substrátu (předpokládáme stálý objem kultury v reaktoru) odtéká část buněk a média odtokem stejnou rychlostí jako přitékající OV. Tento stav poskytuje MO dostatečný přísun živin (růst tak není ničím limitován) a zároveň je jejich mikrobiální aktivita na nejvyšší možné úrovni.

Přítok je v průběhu celého zapracování modelů realizován čerpadly, které v daném časovém intervalu realizují konstantní dodávku OV. Průtok je v prvopočátku nízký a je zvyšován dle možností MO se adaptovat na zhoršující se podmínky prostředí.



Obrázek 23 - Průběh CHSK surové vody, doby zdržení a látkového zatížení, pro reaktory KR, BA

Přítok OV se v laboratorním modelu pohybuje v rozmezí 200 ml/den až 1200 ml/den, doba zdržení pro dvoulitrovou nádobu je tak od 10,00 dní do 1,67 dne. Průměrná hodnota v průběhu experimentu jest 576,5 ml/den (doba zdržení 3,5).

Na CHBČOV Draslovka Kolín je průtok OV 25 m³/den až 152 m³/den, doba zdržení pro obě nádrže o objemu 2x260 m³ (sériové propojení - 520 m³) tak činí minimálně 20,80 dne a maximálně 3,42 dne. Průměrná hodnota v období 6.4.08 až 15.3.09 je 98 m³/den (doba zdržení 5,3 dne).

Součin parametrů průtok reaktorem za den [ml/den] a hodnoty CHSK surové vody přitékající do reaktoru [mg/l] určují veličinu zvanou látkové zatížení. Přítoková voda by měla být v rámci látkového zatížení konstantní. Budou-li se výrazně měnit hodnoty CHSK, které mohou oscilovat například dle požadavků podniku na výrobu, je vhodné korigovat přítok této vody do reaktoru. Snahou je maximalizovat přítok dle přípustného látkového zatížení (dáno schopnostmi MO), což minimalizuje odtokového znečištění. Vhodné by tak v reálné praxi bylo, umístit před reaktory vyrovnávací nádrž, která by umožnila vyrovnávat přítok OV do bioreaktorů v závislosti na hodnotě CHSK (dlouhodobě neměnné látkové zatížení).

Nutné je uvažovat, že v reálné praxi se průtok mění v čase velice nespojitě a jeho vývoj je velice nerovnoměrný (*Obrázek 22*), stejně tak i jeho látkové zatížení. V laboratorním ověřování byl průtok a látkové zatížení v delším časovém horizontu naprosto ideální (konstantní průtok a konstantní látkové zatížení). Pokud by tedy podnik stabilizoval odtokové látkové zatížení (stanoveno dle CHSK) a jeho průtok, bylo pak možné snížit dobu zdržení v reaktorech až 1,5krát (maximálně 2krát).

9.2 CHSK

Obsah organických látek v odpadních vodách lze souhrnně charakterizovat chemickou spotřebou kyslíku (CHSK – kapitola 6.1.1). Při hodnocení průmyslových odpadních vod je třeba věnovat velkou pozornost možné přítomnosti anorganických látek, které se v podmínkách stanovení CHSK oxidují a tím zkreslují její hodnotu [33]. V laboratorních zkouškách s reálnou OV z podniku Draslovka se jedná především o vysoký obsah solí (zejména Cl^-), vzorek je tak nutno dostatečně ředit (dle měření a druhu použitých vyhodnocovacích testů).

Při laboratorním stanovení CHSK byly využity jednoúčelové testy COD (Chemical Oxygen Demand – výrobce HachLange), které jsou založeny na využití dichromanové metody. Oxidace probíhá v silně kyselém prostředí za dvouhodinového varu. Oxidovatelná složka reaguje s kyselinou sírovou, roztok dichromanu draselného reaguje v přítomnosti síranu stříbrného (Ag^+), jako katalyzátoru. Za těchto podmínek dochází k oxidaci i velmi stabilních látek. Stanovení je silně rušeno přítomností chloridů (maximální hranice koncentrace pro tyto testy je 1500 mg/l chloridů). Tyto ionty jednak tvoří sraženinu s katalyzátorem (Ag^+), jednak podléhají oxidaci s dichromanem, což vede k pozitivní chybě stanovení. Jejich přítomnost je nutné maskovat síranem rtuťnatým (Hg^{2+}). Redukce probíhá ve žlutém zbarvení, k vyhodnocení hodnoty CHSK je užito spektrofotometrické stanovení Cr^{6+} . Dichromanová metoda je použitelná pro sledování všech vod tedy i odpadních. [39], [34]

V reaktoru předpokládáme látky v rozpustné formě, ovšem se změnou teploty může docházet například k jejich srážení (například DPG). Průměrná hodnota CHSK pro celoroční pozorování pro nosiče AnoxKaldnes (KR) činí 615 mg/l, pro nanovláknenné nosiče (BA) je tato hodnota 525 mg/l. Průměrná hodnota CHSK přiváděné surové vody je 3600 mg/l, průměrná účinnost procesu pro celoroční pozorování je tak pro KR – 83 %, BA – 85,5 %. Technologie na bázi nanovláken (nosiče s označením BA) se tak zdají z dlouhodobého hlediska optimálnější, a to v průměru o 10 % až 42 %, v závislosti na teplotě a dalších podmínkách (dokumentuje *Tabulka 14*, strana 65).

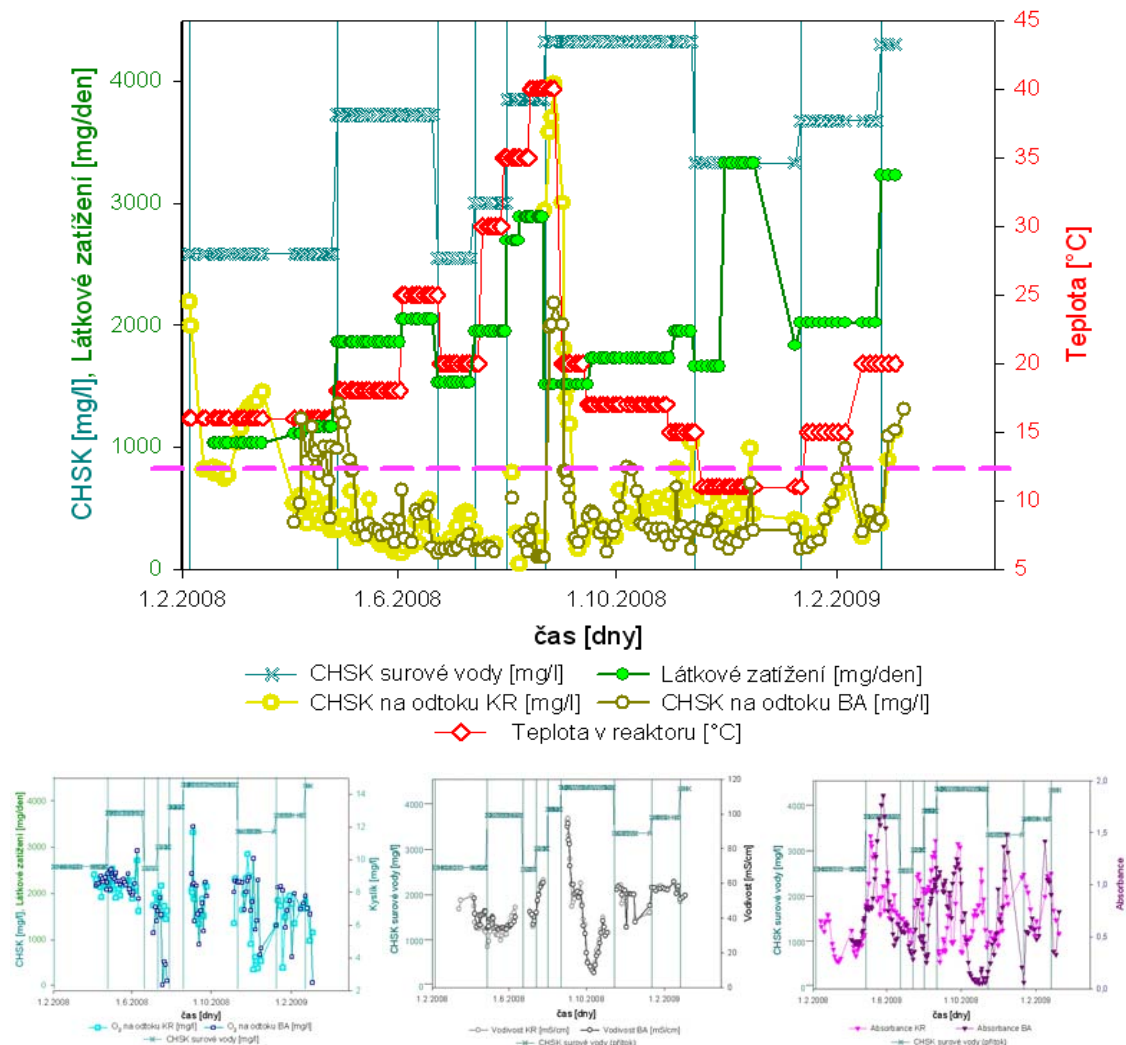
Jako limitní stav účinnosti CHSK vezmeme hodnotu 800 mg/l (stanovena v závislosti na několika zdrojích [40] a mnoho dalšího). V grafu *Obrázek 24* je vyznačena vodorovnou růžovou čarou. Obě posuzované technologie (KR, BA) jsou v průběhu experimentu v přípustném rozmezí. Výjimkou je doba adaptace mikrobiální populace a období s maximální měřenou teplotou, kdy ani jeden z reaktorů není dostačující.

Vysoká hodnota CHSK může na MO působit inhibičně (zejména v dostatečně neadaptovaném stavu). Výsledkem je možnost odpadávání biofilmu z nosičů a radikální snížení absorbance, což zapříčiní následně vyšší obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě (není nikým spotřebováván). Biologická dostupnost perzistentních látek se však časem snižuje. Rychlost „stárnutí“ polutantu je značně závislá nejen na jeho chemické struktuře a koncentraci, ale i na typu média. [18]

Vše je závislé na podmínkách v reaktoru. Pokud bude například při adaptaci zvolena OV o hodnotě 3000 mg/l CHSK a následně se přejde na dvojnásobek, je vhodné snížit průtok OV. Jinak je velice pravděpodobné, že dojde k toxickému efektu, což lze okamžitě vypožorovat snížením optické density média (při kontinuální kultivaci dojde k vyplavování MO ze systému). Pokud se tak stane je vhodné přítok zastavit a dále dávkovat jen přiměřené množství anilínu, který je MO mnohem jednodušejší degradován. Toxický efekt může být způsoben nejen vysokou koncentrací hlavních

kontaminantů (anilin, DPG, CN⁻) a meziproduktů výroby, ale také vysokou salinitou OV, případně dalších nežádoucích látek, které mohou být v OV přítomny. Po obnovení aktivity MO (zvýšení optické density média) se přítok může opět zapojit a pokračovat v kultivaci.

V obou modelech se vyskytuje bakteriální suspenze, která zejména v úvodních fázích realizuje velké procento odstraňování anilinu a ostatních substrátů. Dle vyhodnocení respiračních testů s nosičem a disperzní populací z CHBČOV Draslovka Kolín, může tato hodnota činit ještě po 2 měsících provozu až 90 % při době zdržení 4,5 dne. [24] Po delším zapracování nosičů se může tato hodnota ještě dostatečně změnit (*Tabulka 18*, strana 71).



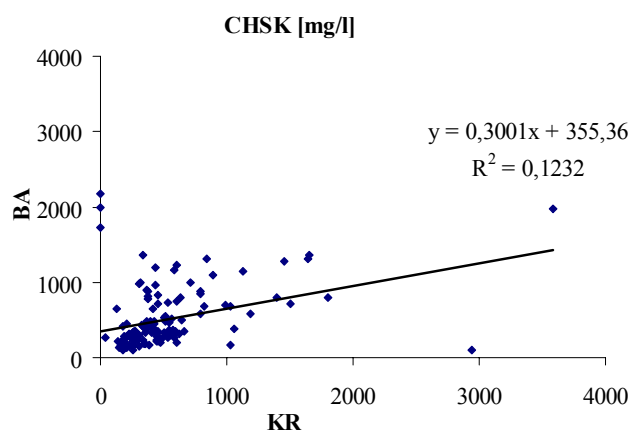
Obrázek 24 - Průběh CHSK v bioreaktorech KR, BA, a další průběhy s tím související

Z hodnot CHSK lze určit dobu zapracování nosiče, která je přibližně rovna času, kdy dojde se snížení odtokové CHSK pod danou limitní hodnotu (při alespoň pěti po sobě jdoucích měření). Počáteční čas nasazení nosičů KR a BA je odlišný, proto došlo k posunutí adaptačního procesu, což lze vypožorovat z grafu *Obrázek 24* (KR nasazeno dne 5.2.2008, BA nasazeno dne 17.3.2008). Pro limitní hodnotu CHSK 800 mg/l je čas adaptace pro KR 59 dnů. Použité nosiče však byly předem kolonizovány v reaktoru Draslovka Kolín. Skutečný adaptační čas by tak mohl být delší. Pro nanovláknennou technologii BA je doba adaptace 53 dnů. Tyto nosiče byly při svém nasazení zcela nové, bez předchozího kontaktu s MO. Navíc v tomto reaktoru během kultivace

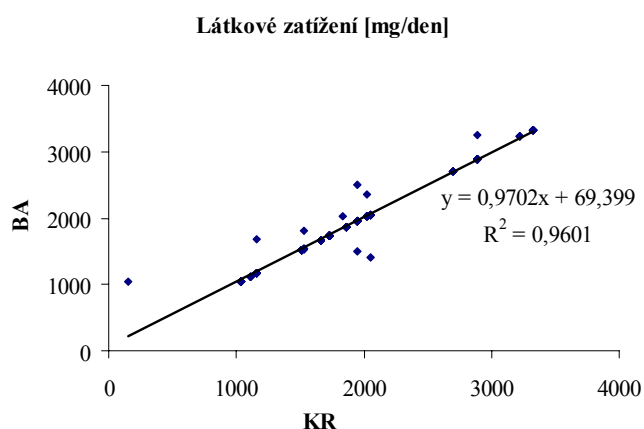
docházelo k mírným změnám parametrů prostředí (snížení doby zdržení, zvýšení teploty). Výsledek tak dokazuje daleko vyšší schopnost nanovlákné vrstvy ke kolonizaci mikroorganismy. Nanovlákná technologie tak umožňují rychlejší zapracování nosiče, a tím také zkrácení potřebné doby kultivace.

Po období prvního přizpůsobení může následovat pomalá či rychlá biodegradace kontaminující látky. Všeobecně však platí, že pokud dojde k opakované kontaminaci prostředí degradovanou látkou již po ukončeném období přizpůsobení, pak následující druhé období přizpůsobení se výrazně zkracuje nebo dokonce chybí. Na *Obrázek 24* je toto doloženo nulovou změnou odtokové CHSK, ačkoli došlo k velkému navýšení přítokové CHSK (v období adaptace cca. 2500 mg/l, poté 3800 mg/l, období kolem 28.4.2008). Zkrácení nebo vymizení období přizpůsobení po opakované kontaminaci je vysvětlováno dostatečným počtem buněk degradujících mikroorganismů vytvořených v průběhu primárního využívání polutantu. Po dalším přidání polutantu probíhá biodegradace vyšší rychlostí. Za toto zvýšení není zodpovědný jen nárůst populace degradujících mikroorganismů, ale také jejich zvýšená metabolická aktivita.

Z naměřených dat byla vynesena závislost $BA = f(KR)$. Následující graf (*Obrázek 25*) porovnává, jak moc jsou si posuzované technologie podobné. Z uvedeného grafu vyplývá, že nově vyvíjená technologie (BA) dosahuje pro celoroční pozorování průměrně nižších hodnot CHSK.



Obrázek 25 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty CHSK



Obrázek 26 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty látkového zatížení

Obrázek 26 předkládá korelaci měřených dat látkového zatížení reaktorů KR a BA. Látkové zatížení bylo takřka totožné.

Tabulka 12 - Kyanidy, anilin a jiné – porovnání technologie Draslovky a laboratorního reaktoru s toutéž technologií („KR“) (ke dni 4.6.2008)

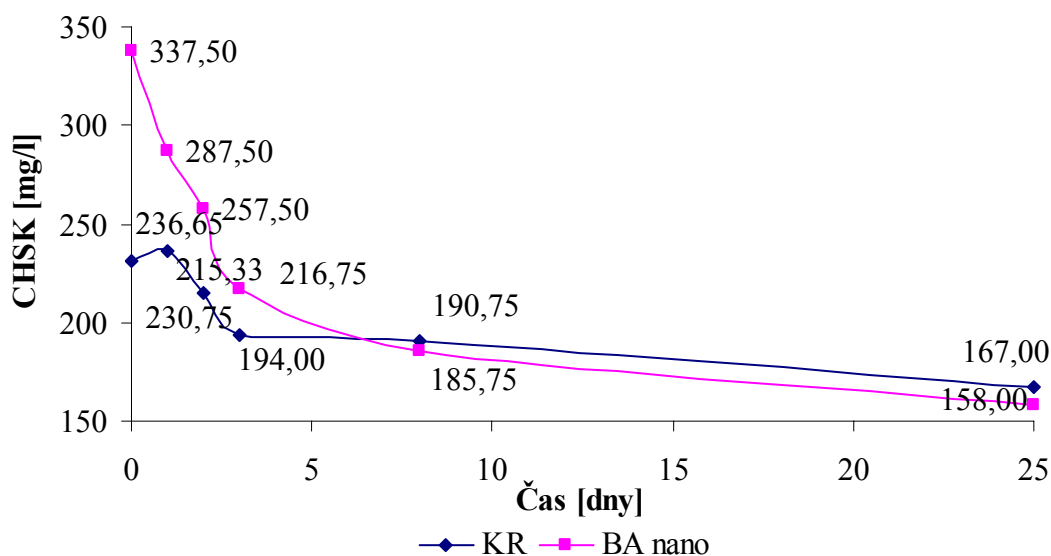
Ukazatel		CHBČOV odtok	KR odtok
Amonné ionty		641,00	381
Fosforečnany	[mg/l]	6,52	12
CHSK _{Cr}	[mg/l]	200,00	150
Kyanidy celkové	[mg/l]	4,81	3
Kyanidy volné	[mg/l]	4,34	2,5
NL 105 C	[mg/l]	122,00	136
DOC	[mg/l]	43,00	44
Anilin	[mg/l]	0,15	0,17

Tabulka 13 – Kyanidy, NL – porovnání stavu reaktoru Anoxkaldnes (KR) a nanovlákněného reaktoru (BA) (ke dni 20.11.2008)

Ukazatel		KR	BA
Kyanidy celkové	[mg/l]	4,26	4,39
NL 105 C	[mg/l]	516	43,6

V navazujících testech by bylo velice vhodné určovat nejen hodnotu CHSK, jako ukazatel organických látek, ale stanovovat zvlášť kyanidy a anilín. Zejména za využití iontové a kapalinové chromatografie. Z těchto výsledků by bylo možné získat závěr, jaká populace MO (zda vázaná na nosič či dispergované volně v médiu) degraduje kterou složku v OV (kyanidy, anilín, DPG). Z toho by bylo dále možné optimalizovat technologii celého procesu v průmyslovém podniku.

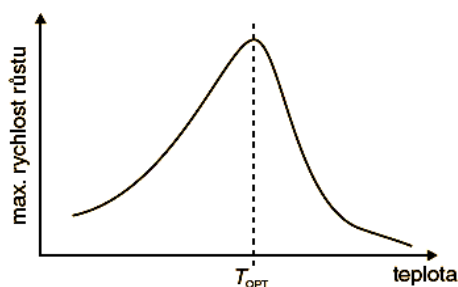
V závěru experimentu proběhl dodatečný test, k určení maximální možné biodegradace daných látek mikroorganismy v reálné odpadní vodě. Schopnost mikroorganismů dokumentuje *Obrázek 27*, na němž obsah polutantů, vyjádřených jako CHSK, neklesne pod hodnotu 150 mg/l. Na odtoku z reaktoru se tak nacházejí zbytkové koncentrace, které jsou pro MO téměř nerozložitelné. Jde o meziprodukty z výroby (prozatím neidentifikované zbytkové organické látky). Velké zkreslení naměřených hodnot CHSK způsobuje vysoký obsah Cl⁻. V OV se vyskytují také amonné ionty (*Tabulka 12*), které při obsahu 500 mg/l zapříčiňují CHSK o hodnotě 100 mg/l.



Obrázek 27 - Možnost úplné biodegradace reálné odpadní vody

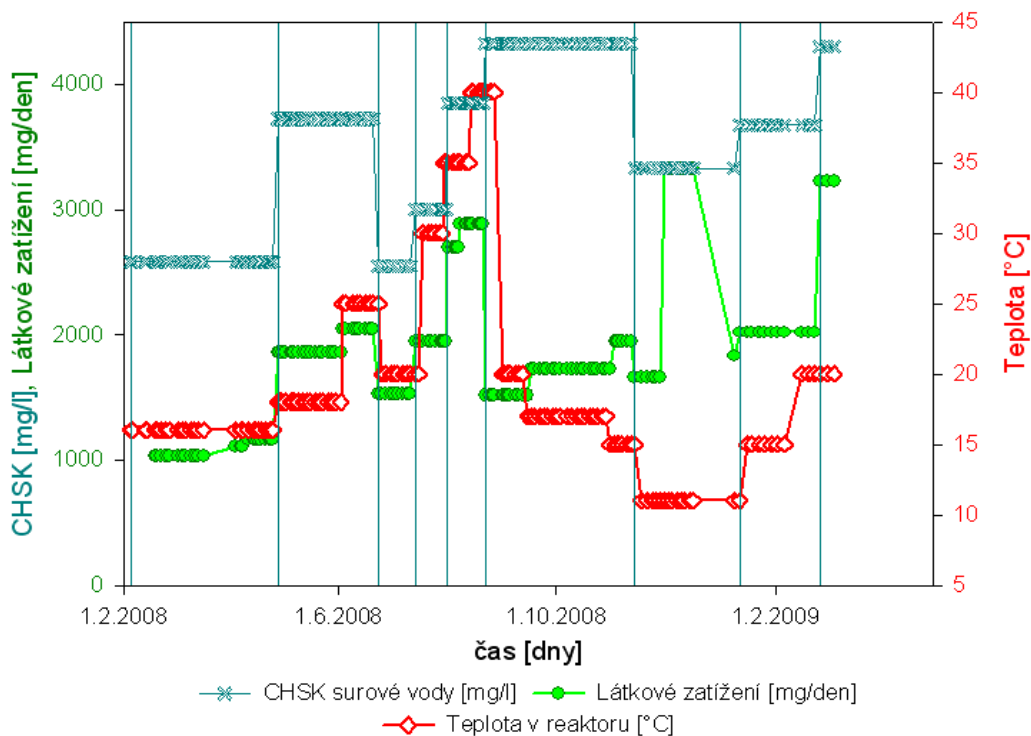
9.3 Teplota

Rychlost biochemických procesů v systému ovlivňuje především teplota. Biodegradace se zpomalí s klesající teplotou (v severnějším klimatu může být biodegradace po většinu roku inaktivní či velice pozvolná). Zvýšení teploty může urychlit degrační proces, extrémní teplota však může rychlost růstu MO inhibovat (proces sterilace bakterií, *Obrázek 28*). V těchto systémech je užitečné proces biodegradace realizovat v teplotně kontrolovaném zařízení. Měření teploty v laboratorních experimentech probíhalo společně s měřením pH kombinovanou skleněnou pH elektrodou.



Obrázek 28 - Závislost maximální rychlosti růstu MO na teplotě [38]

Teplota také ovlivňuje nebiologické mechanismy degradace kontaminantů. Při vyšších teplotách dochází k odparu vody a tím k zahušťování kultivačního prostředí, což následně vede k nárůstu salinity. Nízké teploty mohou být příčinou srážení látek. Obecně rozpustnost kontaminantů stoupá s rostoucí teplotou (výjimku mohou tvořit například některé uhlovodíky). Teplota je určujícím prvkem při měření pH, ORP a dalších parametrů. Vliv má také na rozpustnost kyslíku, vodivost OV, způsobuje vyšší odpar vody čehož důsledkem je zvýšení její salinity. Dokonce i samotný růst MO může mít za následek zvýšení teploty (produkce tepla spotřebováváním živin z prostředí).



Obrázek 29 - Průběh teploty v bioreaktorech KR, BA

V laboratoři byla pozornost zaměřena především na závislost účinnosti degradace na teplotě (dle hodnot CHSK). V průmyslu má toto hlavní smysl především z důvodu významného střídání teplot v období léto-zima, rozdíl může být až 30 °C. Teplota v systému, tak byla postupně regulována z hodnoty 10 °C až k hodnotě 40 °C. Maximální teplotní mez byla určena z hodnot CHSK, kdy došlo k jejímu velkému navýšení, nesmělo však dojít k usmrcení MO (hodnocení růstu optickou densitou). U horní hranice bylo pozorováno zvýšené odumírání bakteriální populace a účinnost čištění OV byla téměř nulová. V tomto období bylo provedeno makroskopické a mikroskopické hodnocení biofilmu (viz. *Obrázek 30*, *Obrázek 31*).

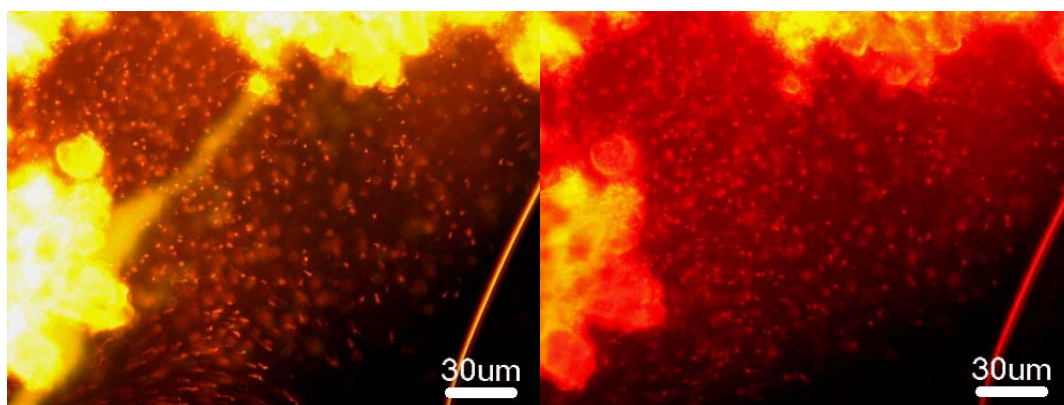
Okamžitě po překročení teploty 40 °C docházelo k prudkému nárůstu hodnot odtokové CHSK, degradace se zcela zastavila pravděpodobně z toxického šoku na MO (kombinace teploty, rozpuštěných anorganických solí, možné vlivy obsahu rozpuštěného kyslíku). CHSK přiváděné OV v tomto období bylo 4325 mg/l CHSK. Odtoková CHSK stejně jako účinnost procesu je v *Tabulka 14*. Pozorován byl vliv na absorbanci, která pro horní hranici v průběhu dvou dnů velice rychle klesala. Dle *Tabulka 14* je vliv vysoké teploty v reaktoru BA daleko lépe snášen než v reaktoru KR, čemuž nasvědčuje měřená optická densita média a poloviční hodnota CHSK na odtoku BA oproti KR.

Tabulka 14 - Vliv teploty a doby zdržení na CHSK a OD

	Teplota	Min. doba zdržení	Odtoková CHSK, účinnost	Optická densita
KR	41 °C	64 hodin	3980 mg/l, $\eta = 8 \%$	1,424 na 0,259
BA	41 °C	64 hodin	2180 mg/l, $\eta = 50 \%$	1,163 na 1,075
KR	10 °C	48 hodin	585 mg/l, $\eta = 82 \%$	1,147 na 0,418
BA	10 °C	48 hodin	260 mg/l, $\eta = 92 \%$	1,147 na 0,644

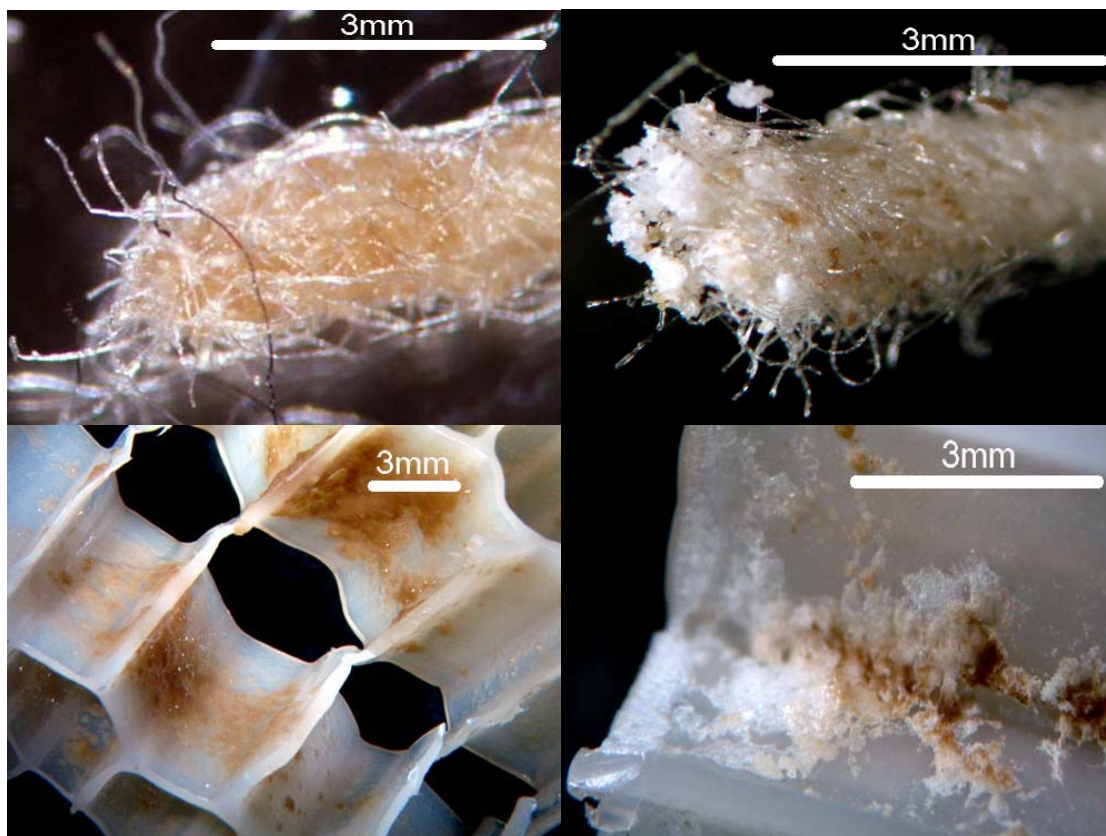
Pro nízkou teplotu (období od 14.11.2008) je hodnota přiváděné OV 3330 mg/l. Účinnost procesu za této teploty je v *Tabulka 14*. Hraniční spodní hranice je tedy nižší, než laboratorně ověřované (*Rhodococcus* velice dobře snáší nižší teploty). Spodní hranice byla ověřována v zimním období, další snížení teploty v laboratoři již nedovolovalo technické vybavení.

Na *Obrázek 30* je pomocí diferenčních barviv zachyceno mikroskopické pozorování bakteriální populace při maximální teplotě 40 °C. Minimální ověřovaná teplota nemá na biofilm tak škodlivé účinky, proto zde vyhodnocena není. Na levé straně *Obrázek 30* jsou zaznamenány všechny bakterie, na pravé pak MO s narušenou membránou, které bychom mohly označit za neživé.



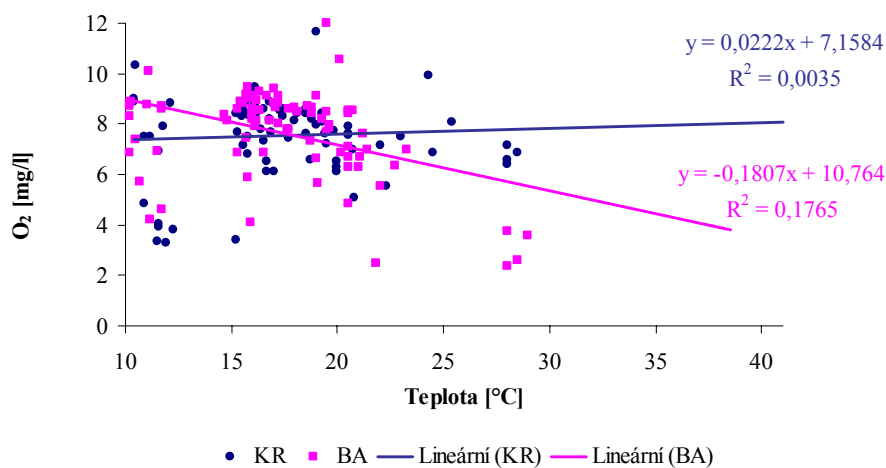
Obrázek 30 – Mikroskopické pozorování bakterií po teplotní sterilaci, foto VŠCHT

Na následujících čtyřech obrázcích (Obrázek 31) je zachyceno jak velký může být synergický vliv vyšší teploty na zvýšení salinity v prostředí (důsledek extrémního odpařování vody z kultivačního media) a důsledek obou vlivů pro bakteriální biofilm. Levá strana obrázků odpovídá teplotě při optimálním růstu MO, vpravo je zachycen nosič při teplotě 40 °C. Pro mezofilní mikroorganismy, jako je *Rhodococcus*, je ideální teplota nižší 45 °C (optimální růst při 37 °C), ovšem mají schopnost růst i při velice nízkých teplotách (až 0 °C).



Obrázek 31 - Makroskopické pozorování bakterií po teplotní sterilaci, foto VŠCHT

Jelikož existuje velká souvislost mezi měřením teploty a rozpuštěným kyslíkem, lze mezi nimi předpokládat velkou míru korelace. Na Obrázek 32 je vynesena závislost naměřených dat rozpuštěného O₂ na teplotě (závislost není lineární, neboť je ovlivněna například zvýšenou salinitou, případně vlivem saturace kyslíku).



Obrázek 32 - Korelace dat O₂, teplota pro KR, BA

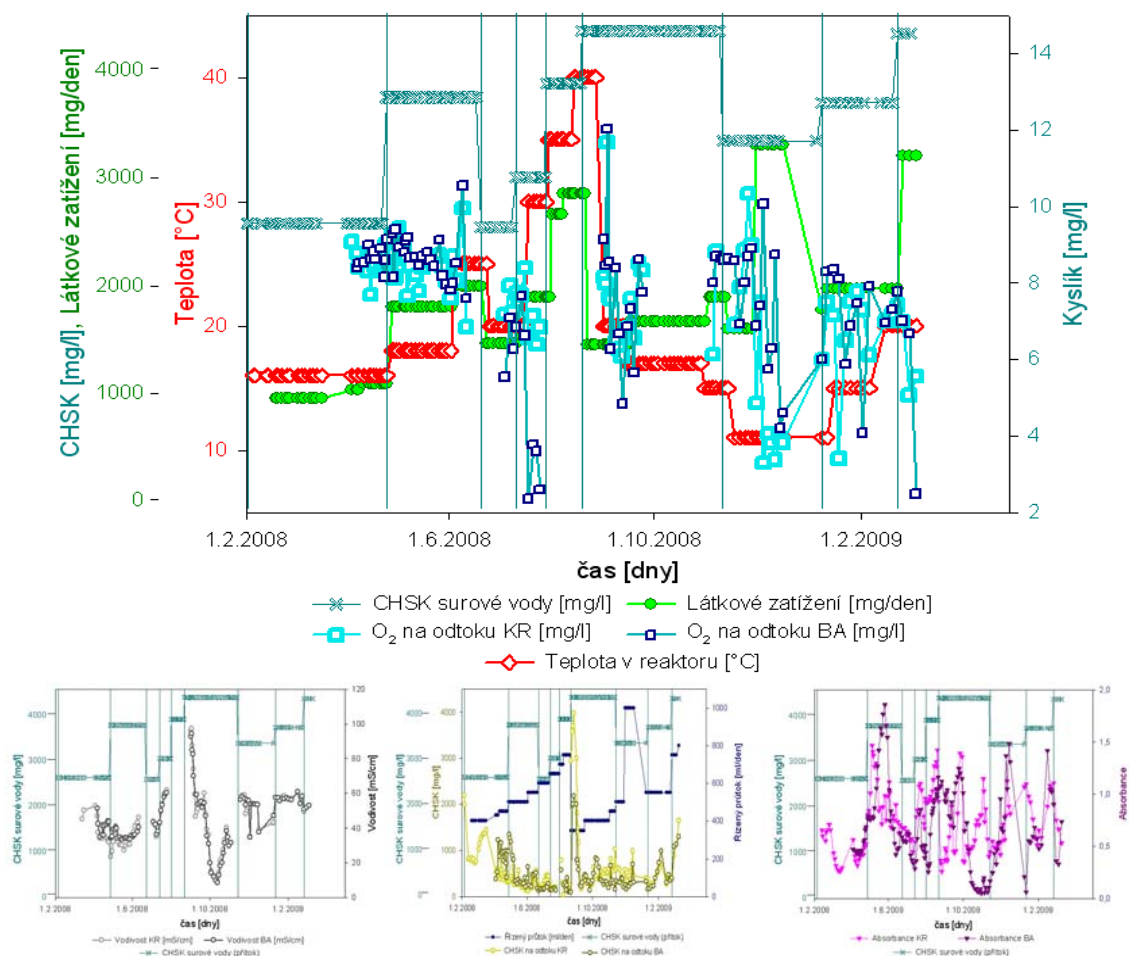
9.4 Rozpuštěný kyslík, respirace

Naprosto nezbytnými látkami, které je nutné do systému s aerobními organismy dodávat, jsou akceptory elektronů (nejčastěji je to kyslík, nitráty). Hladina kyslíku je u aerobních ex-situ metod snadněji kontrolovatelná a lze ji udržet mechanickým mícháním nebo provzdušňovadly (zavádění vzduchu ke dnu reaktoru). Koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě je jedním z hlavních ukazatelů kvality vody. Je významným indikátorem biologického znečištění povrchových vod a důležitým parametrem, který určuje efektivitu procesu v biologických ČOV. Mikroorganismy využívají především kyslík, který je rozpuštěn v kapalině. Rozpustnost kyslíku v kapalině je nízká a závisí na teplotě a parciálním tlaku kyslíku. Maximální dosažitelné množství rozpuštěného vzduchu ve vodě při 25 °C, 100 kPa je 39,5 mg/l, při 21% obsahu O₂ je konečná hodnota 8,4 mg/l. V závislosti na druhu organismu je dána minimální koncentrace O₂. Obecně bezpečná hranice rozpuštěného O₂ je 2 mg/l (platí především pro vločky MO a masivní biofilmy). Vhodné je tak zajistit co největší součinitel přestupu kyslíku, parametr závisí na konstrukci a umístění míchadel a aerátorů, na frekvenci otáčení míchadla, fyzikálně-chemických vlastnostech kapaliny, tvaru distributoru vzduchu, velikosti vzduchových bublin atd. [41]. Ačkoli pro jemnobublinnou aeraci platí daleko efektivnější využití kyslíku ze vzduchu (lepší koeficient přestupu kyslíku), byla využita středněbublinná aerace (průměr bublin je asi 2 až 5 mm), zejména z nutnosti udržení nosičů ve vznosu, další míchadlo použito nebylo.

Pro měření koncentrace kyslíku ve vodě jsou používána především amperometrická membránová čidla, které tvoří polarizovaná platinová elektroda (katoda) a nepolarizovaná argentochloridová elektroda (anoda). Obě elektrody jsou ponořeny do elektrolytu a odděleny od měřeného prostředí homogenní separační membránou propustnou pro kyslík (ale i pro jiné plyny, jako např. H₂S, SO₂, CO₂, Cl₂), avšak nepropustnou pro ionty a většinu adsorbtivních nečistot v roztocích obvykle přítomných, které by v nepřítomnosti membrány interferovaly, nebo rušily redukci kyslíku. Měřená hodnota je automaticky korigována podle teploty a barometrického tlaku. Laboratorní přístroj umožňuje rovněž automatickou korekci podle celkového obsahu solí ve vodě. [42], [43]

Teplota je určujícím parametrem pro rozpustnost kyslíku, který ve vodě klesá s rostoucí teplotou (laboratorní měření na *Obrázek 33*). Obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě se vyjadřuje hmotnostní koncentrací [mg.l⁻¹]. Dalším možným vyjádřením je procento nasycení vody kyslíkem, vztaženo k rovnovážné koncentraci kyslíku za dané teploty a daného atmosférického tlaku. Množství kyslíku závisí kromě teploty na atmosférickém tlaku a množství rozpuštěných látek ve vodě. [51] Kyslík je z vody spotřebováván k dýchání organismů a na veškeré oxidační procesy jak organických, tak anorganických látek. Dle obsahu kyslíku lze usuzovat na degradační schopnosti MO, čehož se využívá především u respiračních testů. Množství kyslíku značně ovlivňuje většinu biochemických procesů a proto je limitujícím faktorem pro život organismů.

Jestliže dojde k zastavení provzdušňování média, spotřebovávají MO zbylý kyslík až do jeho vyčerpání, čehož se dále využívá u respiračních testů. Technologický proces v laboratoři je proto veden tak, aby kyslíku byl přebytek (obsah bioreaktoru se intenzivně provzdušňuje a promíchává aerátory).



Obrázek 33 - Průběh O_2 v bioreaktorech KR, BA, a další průběhy s tím související

Průměrná hodnota O_2 při celoročním pozorování pro nosiče AnoxKaldnes (KR) činí cca. 7,54 mg/l, kdežto pro nanovláknenné nosiče (BA) je tato hodnota 7,61 mg/l. Rozdíl je velice minimální a můžeme jej zanedbat. Může být způsobena mírně rozdílným látkovým zatížením reaktorů (chybné dávkování OV). Vyšší koncentrace rozpuštěného O_2 pro BA může být způsobena například rozdílnou aerační technikou (typ a výkon byl dle výrobce pro oba systémy totožný). Bohužel obsah O_2 pro maximální teplotu zjištěn z důvodu absence měřicí techniky nebyl. Minimální naměřený obsah O_2 3,3 mg/l nastal při teplotě 12 °C, v tomto období došlo k nejvyššímu látkovému zatížení (maximální průtok OV), tedy došlo k maximální spotřebě O_2 .

Korelace vlivu rozpuštěného kyslíku ve vodě detailněji dokládá graf na *Obrázek 32*, který potvrzuje, že zvyšování teploty podporuje růst MO, které tak potřebují více O_2 , jenž se tak v roztoku nalézá v menší koncentraci. Výrazný vliv je pozorován pro technologii BA. MO v tomto reaktoru mají lepší podmínky pro rozmnožování (možný pozitivní vliv užití nanovláknenné vrstvy). Závislost na teplotě je nelineární, viz. kapitola 9.3 *Teplota*.

9.4.1 Respirační testy měřením úbytku O_2

Respirace reflektuje mikrobiální metabolismus organických substrátů přítomných v prostředí. V počáteční fázi respiračního testu probíhá nasycení média rozpuštěným kyslíkem na koncentraci kolem 6 mg/l. Úvodní několikaminutová fáze provzdušňování aerátory dodá do systému dostatek kyslíku. Poté dojde k nadávkování anilinu o koncentraci (Draslovka - 500 mg/l), (laborať - 5 mg/ml). [44]

Základem je nádobu důkladně uzavřít a zamezit tak přístupu vzduchu difúzí z okolí. Měření O₂ probíhá celkem cca 70 minut. Pokud dojde k poklesu rozpuštěného kyslíku v nádobě, pak je systém opět provzdušňován (celkem třikrát). Teplota v systému se pohybovala v rozmezí cca 16 °C až 20 °C, pH odpovídá testované OV. Podstata respirace je měření poklesu kyslíku v reaktoru. Následně jsou vyhodnoceny rychlosti respirací při endogenní a exogenní fázi.

Za účelem zachování shodných podmínek kvality média, substrátu a nosiče byly testy provedeny z každého reaktoru vždy takto: suspenze, suspenze + nosič. V laboratorních podmínkách i jen samotný nosič.

Pro stanovení respirace v podniku Draslovka platí: Do 2 l reakční nádoby bylo přidáno 100 ks nosiče, což odpovídá plnění reaktoru 42 %. Vyšší plnění pro testy ve srovnání s reálným plněním reaktorů bylo zvoleno z důvodu, aby volumetrické rychlosti respirace byly vyšší a snáze vyhodnotitelné. Tyto rychlosti jsou následně přepočítány na skutečné plnění reaktorů 25 %. [44]

Laboratorní stanovení respirace: Do jedno-litrové reakční nádoby bylo přidáno 41 ks nosiče KR (případně 17 ks nosiče BA), což odpovídá plnění reaktorů 30 %. Dispergovaná bakteriální suspenze byla přidána dle daného typu testu.

Dávkování anilinu bylo provedeno koncentrátem. Pozorováno bylo jeho postupné rozpouštění (cca 2 – 3 min), při vyhodnocení není tato náběhová fáze uvažována (při odečítání maximální dosažené respirační rychlosti).[44]

9.4.1.1 Vyhodnocení respiračních testů ČOV Draslovka Kolín

Respirační testy probíhaly dne 17.6.2008. Pro kompletnější přehled aktuálního stavu OV daný den (možný vliv na následné vyhodnocení respiračního testu) je uvedena následující tabulka – přehled přítokových koncentrací a fyzikálně chemických parametrů do reaktorů na CHBČOV Draslovka (tabulka platí pro reaktor 1 i reaktor 2).

Tabulka 15 - Přehled zatížení CHBČOV Draslovka Kolín na přítoku dne 17.6.2008

CHSK _{Cr}	anilin	CN _{celk.}	NL 105°C	pH	NH ₄ ⁺	průtok
[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[m ³ /den]
2720	609	303	152	7,3	137	100

Výpočet respiračních testů je proveden podnikem Draslovka Kolín, následuje na další stránce. V podniku se nacházejí dva reaktory, pro každý z nich je výpočet proveden zvlášť. Základem je stanovení sušiny pro suspenzi a pro nosiče.

Tabulka 16 - Vyhodnocení respiračních testů ČOV Draslovka Kolín, ke dni 17. 6. 2008 [44]

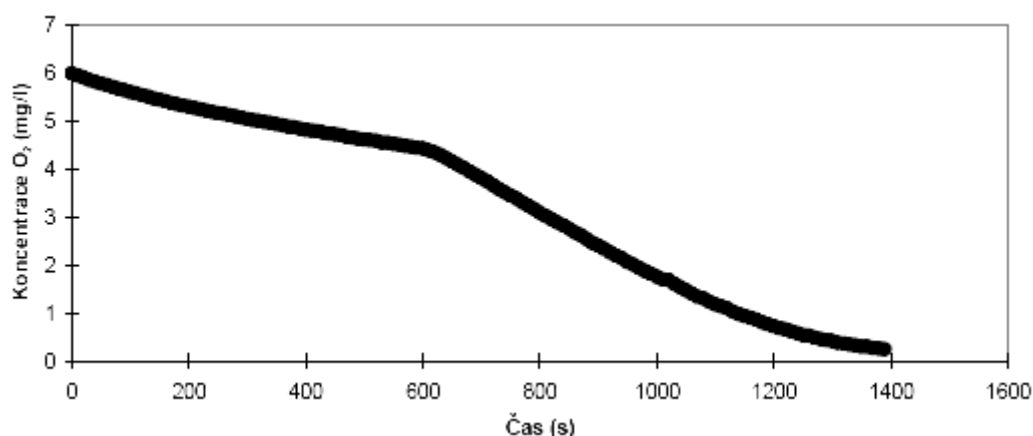
Matrice	X suspenze [mg/l]	X nosič [mg/l]
Suspenze, reaktor 1	830	-
Suspenze, reaktor 2	645	-
Suspenze + nosič (42 %), reaktor 1	830	4540
Suspenze + nosič (42 %), reaktor 2	645	2460

Matrice	r _V , CELKEM [mg/l.h]	r _V , SUSPENZE [mg/l.h]	r _V , NOSIČ [mg/l.h]	r _V , nosič/celk [%]
Suspenze + nosič (25 %), reaktor 1	23,42	20,51	2,91	12,42
Suspenze + nosič (25 %), reaktor 2	27,58	24,53	3,05	11,05

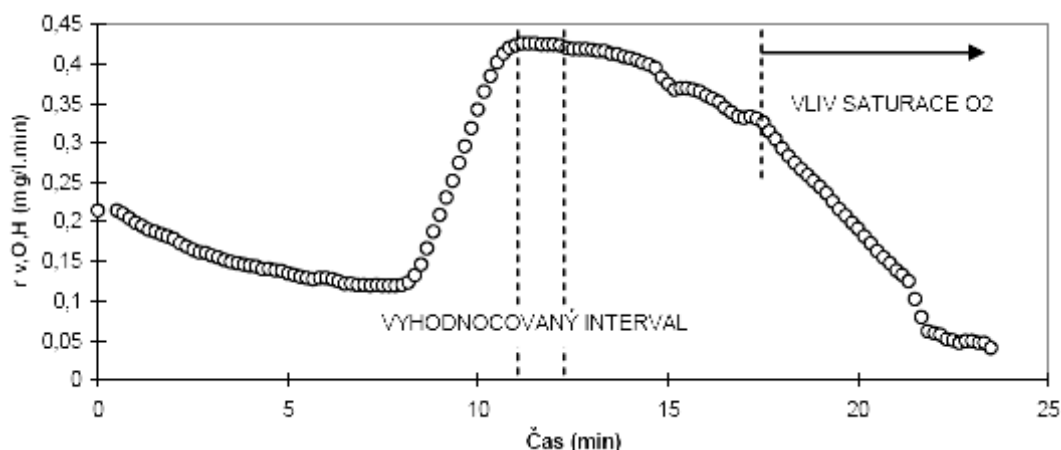
Provedené testy ukazují, že kultivovaná biomasa velmi zřetelně odstraňuje anilin. Změna respiračních rychlostí z endogenní do exogenní (po nadávkování anilinu) je jednoznačně patrná a zvýší se 3x – 5x po nadávkování anilinu. [44]

Aktivita bakteriální suspenze se podílí na odstraňování anilinu rozhodujícím způsobem. V provozním reaktoru je až cca 90 % anilinu odstraňováno právě biomasou v suspenzi. Vzhledem k nízkému plnění nádrží nosičem biomasy (pouze 25 %) se biofilmová kultura v současné době podílí na odstraňování anilinu cca 10 – 13 %. Nárůst biofilmu je dlouhodobou záležitostí a lze proto v budoucnu očekávat zvýšení podílu odstraňování anilinu biofilmem. [44]

Hodnota $r_{V, NOSIČ}$ byla vypočtena jednoduchým rozdílem $r_{V, CELKEM} - r_{V, SUSPENZE}$. Tento přístup ovšem není správný. Důkaz chybné metody je doložen měřením v laboratorních podmínkách, které následuje. Z tohoto důvodu není ani správné uvažovat hodnotu $r_{V, nosič/celk}$ [%], neboť ta je tak zatížena velkou chybou, důkaz opět následuje.



Obrázek 34 - Průběh respiračního testu, Reaktor 1, suspenze+nosič [44]



Obrázek 35 - Znázornění průběhu respiračních rychlostí, Reaktor 1, suspenze+nosič [44]

9.4.1.2 Vyhodnocení experimentální respiračních testů (pro různé teploty)

V laboratorních podmínkách byla ověřována respirační rychlost pro různé teploty. Pro výpočet respirace je třeba znát také sušinu, tabulka rychlostí respirace v závislosti na teplotě následuje.

Tabulka 17 - Stanovení sušiny pro různé teploty

Matrice	(16°C)	(22°C)	(16°C)	(22°C)	(16°C)	(22°C)
	X_{SUSP}	X_{SUSP}	$X_{NOSIČ}$	$X_{NOSIČ}$	X_{CELK}	X_{CELK}
	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
suspenze, reaktor KR	1590	990	-	-	-	-
suspenze, reaktor BA	880	740	-	-	-	-
suspenze + nosič (30 %), KR	1590	990	8810	9310	10400	10300
suspenze + nosič (30 %), BA	880	740	11050	7320	11930	8060
nosič (30 %), reaktor KR	-	-	8810	9300	-	-
nosič (30 %), reaktor BA	-	-	11050	7300	-	-

Tabulka 18 - Vypočtené rychlosti pro různé teploty

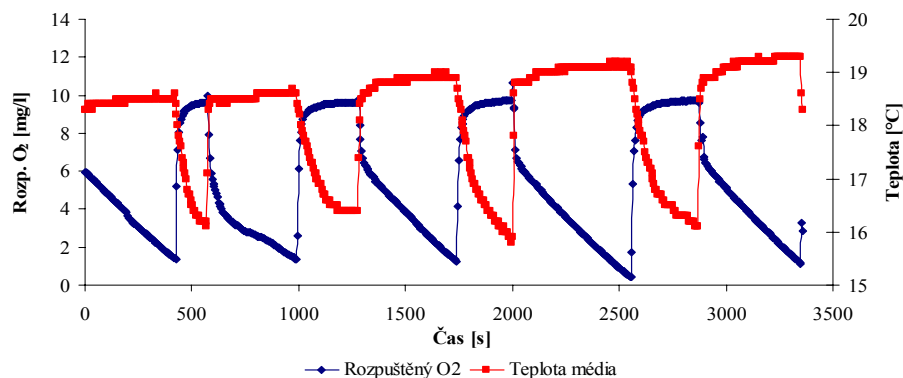
Matrice	(16°C)	(22°C)	(16°C)	(22°C)	(16°C)	(22°C)	(16°C)	(22°C)
	$r_{V, CELK}$	$r_{V, CELK}$	$r_{V, SUSP}$	$r_{V, SUSP}$	$r_{V, NOSIČ}$	$r_{V, NOSIČ}$	$r_{V, nosič/celk}$	$r_{V, nosič/celk}$
	[mg/l.h]	[mg/l.h]	[mg/l.h]	[mg/l.h]	[mg/l.h]	[mg/l.h]	[%]	[%]
Suspenze, nosič (30 %), reaktor KR	39,32	13,54	35,08	9,31	8,33	1,68	21,19	12,41
Suspenze, nosič (30 %), reaktor BA	28,27	40,35	25,73	38,77	12,92	5,55	45,70	13,75

Výpočet $r_{V, NOSIČ}$ ze vzorce:

KR	$r_{V, NOSIČ} = r_{V, CELK} - r_{V, SUSP}$	4,24	4,23	10,78	31,24
BA	$r_{V, NOSIČ} = r_{V, CELK} - r_{V, SUSP}$	2,54	1,58	8,98	3,92

Tabulka 18 uvádí rychlost $r_{V, NOSIČ}$, která byla změřena pro nosič s biomasou ve vodě (stejně salinity jako reálná OV). Pod tabulkou je uveden výpočet hodnoty $r_{V, NOSIČ}$ rozdílem ($r_{V, CELKEM} - r_{V, SUSPENZE}$). Rozdíl hodnot dokládá mylný přístup součtu jednotlivých rychlostí. Bakterie dispergované v roztoku a bakterie vázané na nosiči v biofilmu degradují zcela jinou rychlostí, pokud jsou v médiu sami a když se v systému nachází obě společenství společně. Ve smíšeném prostředí probíhají konkurenční degradační postupy MO dispergovaných a MO vázaných. Celková rychlost procesu se tak snižuje, pokud jsou tyto populace v systému společně. Rychlost pro kombinovaný systém MO nelze spočítat pouhým součtem jednotlivých naměřených rychlostí suspenze a nosič. Je tedy třeba měřit jak společnou respiraci, tak respirace každé frakce zvlášť.

Obrázek 36 dokládá průběh respiračního testu (úbytek O_2 v závislosti na čase, případně provzdušňování média). Úbytek kyslíku v médiu je důkaz degradace anilínu MO. Zároveň dochází k mírnému vzestupu teploty. Růst MO doprovází produkce tepla.



Obrázek 36 - Příklad měření respirační rychlosti pro reaktor KR, suspenze + plněním nosiče 30 %, při kultivační teplotě 16 °C

9.5 Živiny

Mikroorganismy vyžadují pro svůj růst následující živiny: makronutrienty (dusík, fosfor), mikronutrienty (draslík, síru, hořčík, vápník, mangan, železo, zinek, měď). A především uhlík, který je pro mikroorganismy zdrojem energie (udržení metabolických procesů, hlavně růstu a reprodukce). Pokud nejsou živiny v prostředí v dostatečném množství, mikrobiální aktivita se zastaví. Obecně je v průmyslových vodách nedostatek dusíku a fosforu (v závislosti na daném podniku). Proto je vhodné tyto živiny přidávat do degradačního systému, a to ve využitelné formě (dusík ve formě amonného kationtu a fosfor ve formě fosfátu, příp. kyseliny fosforečné). Fosfáty (ale i oxid uhličitý, který je produkován mikroorganismy jako vedlejší produkt aerobní respirace) reagují s minerály (vápník, hořčík nebo železo) za vzniku stabilních sraženin (v půdě tak mohou ucpávat póry). Takovéto reakční produkty mohou nepříznivě ovlivnit účinnost biodegradace v systému. Navíc toto srážení vápenatých nebo hořečnatých fosfátů, je činí nedostupnými pro mikroorganismy, které je tak nemohou využít jako živiny. [15], [51]

Do nitra a nakonec ven (zdroje živin a odpadní hmota) se látky dostávají skrze cytoplazmatickou membránu (odděluje živý obsah buňky od jejího okolí, neizoluje ji však úplně). Všechny metabolické reakce se však odehrávají jen uvnitř buňky, separátně od okolního prostředí. Hlavní úlohu při transportu látek do nitra buňky hraje difúze, což je nejjednodušší a pro buňku nejméně energeticky náročný způsob, který je však umožněn pouze některým malým molekulám, jako je kyslík O_2 nebo oxid uhličitý CO_2 , které se řídí koncentračním rozdílem (gradient). Pro transport velkých molekul (vysokomolekulární substrát), je zapotřebí proces označovaný jako cytóza, u něhož již musí buňka vynaložit určité množství energie. [45]

Obsah mikronutrientů v reaktorech bohužel nebyl sledován dostatečně často. Makronutrienty byly v systému v přebytku (N dostatečné množství v OV, fosforečnany dodávány v nadbytku). V navazujících testech by ke stanovení bylo vhodné užít například iontovou chromatografii.

Tabulka 19 - Obsah nutrientů v OV Draslovka, ke dni 15.4.2008

Označení	draslík [mg/l]	hořčík [mg/l]	vápník [mg/l]	železo [mg/l]	fosforečnany [mg/l]	sírany [mg/l]
KR	35,7	7,5	270	1,34	10,4	66,1

Tabulka 20 – Nutrienty v bioreaktoru KR, BA, ke dni 21.11.2008

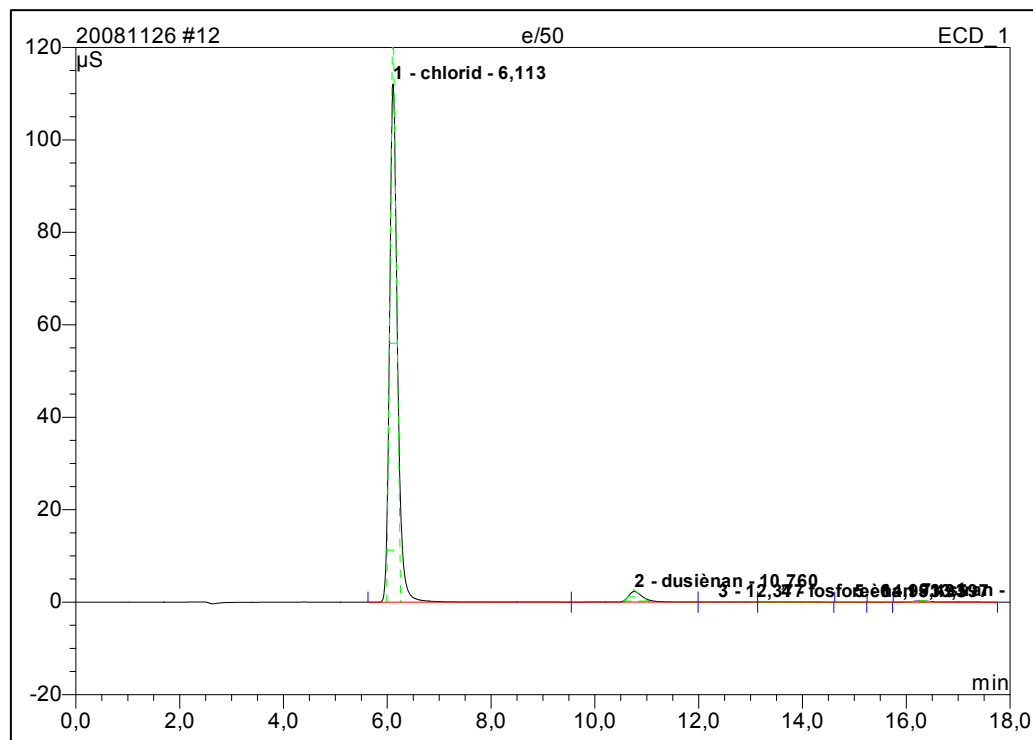
Označení	chloridy [mg/l]	dusitany [mg/l]	bromidy [mg/l]	dusičnany [mg/l]	fosforečnany [mg/l]	sírany [mg/l]
BA	26 688,895	n.a. ⁴	8,615	25,735	34,865	108,625
KR	26 699,825	n.a. ⁴	n.a. ⁴	52,570	26,580	118,895

V odpadních vodách Draslovky Kolín je přítomnost dusíku dostatečná (ve formě amonného iontu NH_4^+), který je dále degradován v následujících fázích nitrifikační čistící linky na dusičnany a dusitany. Průměrná hodnota NH_4^+ surové vody je 198 mg/l. Fosforečnany jsou také udržovány na dostatečné hodnotě, průměrná hodnota fosforečnanů v surové vodě je 15 mg/l (dle měření Draslovky Kolín). Ostatní hodnoty

⁴ Koncentrace látky byla pod detekčním limitem přístroje, případně ve vodě nebyla vůbec stanovena.

jsou přijatelné. Velkým problémem může být pro MO vysoká koncentrace chloridů 26,7 g/l. Podrobnější vliv na MO je rozepsán v následující kapitole 9.8 *Konduktivita, vodivost*.

Podíl obsahu chloridů a nutrientů ve vodě dokumentuje následující *Obrázek 37*, vyhodnocený iontovou chromatografií na TUL.



Obrázek 37 – Graf podílu nutrientů a chloridů v surové vodě (50x ředěno)

9.6 Hodnocení bakteriálního růstu

Proces biodegradace organických látek v přírodě je vázán na růst mikroorganismů. Velkým význam při hodnocení stavu bakteriálního společenstva tak hraje kontinuální sledování MO v systému. MO se v laboratorním modelu bioreaktoru nacházejí buď dispergované v roztoku, nebo přichycené na nosiči ve formě biofilmu. Obě tato hodnocení MO jsou v podstatě samostatné a nezávislé a obecně nelze odvodit z jedné druhou [41]. Dispergované MO lze jednoduše hodnotit vývojem optické density (kapitola 9.6.1). Hodnocení vývoje biofilmové populace MO tak jednoduché není. Nejjednodušším způsobem je stanovení sušiny na nosiči, které je ovšem zatíženo velkou chybou nerozpuštěných látek, které jsou v OV přítomny (kapitola 9.6.2). Dalším způsobem je mikroskopické pozorování a následná obrazová analýza stavu biofilmu (kapitola 9.6.3.1).

Optimální podmínky pro růst MO (růstová rychlost) jsou pro každý mikroorganismus, typ výživného média a způsob kultivace odlišné. Specifická rychlost je dána vnitřními faktory, tj. vlastními růstovými schopnostmi mikroorganismu, vnitřními limity jeho růstu, které jsou určeny genetickým vybavením buňky. Vedle vnitřních faktorů je specifická růstová rychlost limitována i faktory vnějšími, tedy prostředím, ve kterém se mikroorganismy množí. Hlavní vlivy jsou doba zdržení, koncentrace substrátu, živiny, O₂, teplota, RAS a pH. V případě, že se jedná o využívání organického znečištění jako zdroje uhlíku a energie pro růst mikroorganismů, je nutné současně pozorovat snižování koncentrace testované organické látky [18] (např. měřením CHSK). Specifická růstová rychlost tak není v průběhu růstu konstantní [46], [41]. Každé sebemenší vychýlení od ideálního stavu může zapříčinit nevratnou změnu mikrobiální populace.

9.6.1 Optická densita

Růst a množení bakteriální populace v tekuté kultuře (určení koncentrace biomasy v kultivačním médiu) lze sledovat pomocí optické density (také nazýváno absorbance či turbidita). Pravidelnost kontroly bakteriálního růstu tak přispívá k možnosti rychlé reakce na případné nežádoucí změny podmínek prostředí.

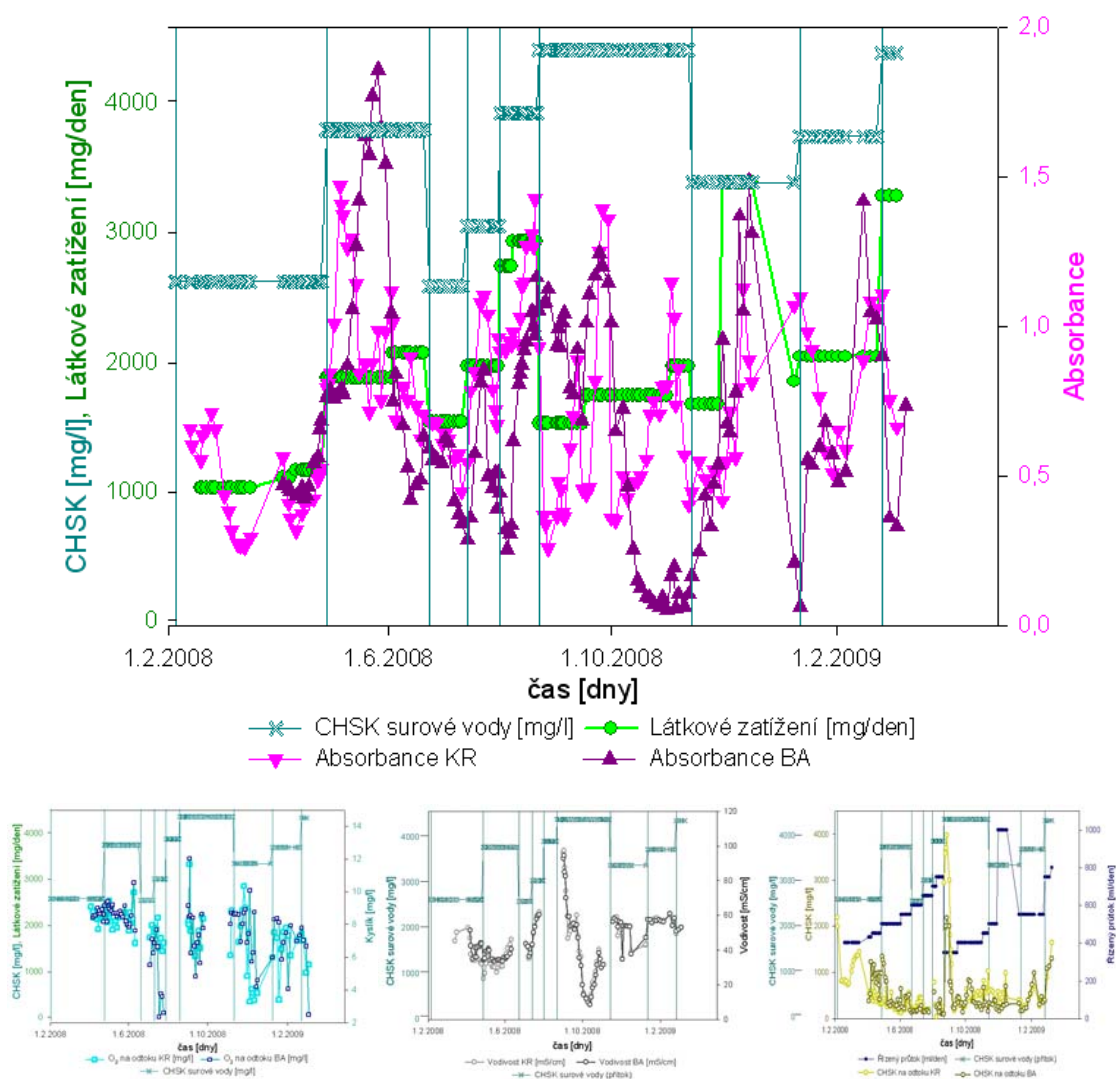
Pro turbidimetrické stanovení buněčné sušiny (případně počtu buněk) lze použít spektrofotometrické stanovení zákalu. Při této metodě je zjišťováno, kolik světla bylo pohlceno (absorbováno) zakaleným roztokem. Buněčná koncentrace byla měřena při vlnové délce 600 nm (oproti blanku, destilované vodě).

Smysluplné je také měření aktivity mikroorganismů, což má úzký vztah k funkcím v ekosystému. Neboť dostatečné není jen velké množství mikroorganismů, ale hlavně aby byly dané MO funkční, tedy aktivní. [47] Příkladem měření aktivity MO jsou respirační testy (uvezeny v kapitole 9.4.1 *Respirační testy měřením úbytku O₂*).

Obrázek 38 dokládá, že i v laboratorním modelu biodegradace, kde ačkoli jsou podmínky mnohem ideálnější než v průmyslové praxi, je průběh koncentrace biomasy v kultivačním médiu velice nestálý. Bakterie reagují na aktuálně se měnící podmínky v systému a přizpůsobují se jim. Jestliže se tedy buňky dostanou do kontaktu se substrátem, kterého mohou využívat pro svůj růst, začnou se rozmnožovat (bakterie dělením). Proces pokračuje dále pokud trvají příznivé podmínky (koncentrace substrátu, přítomnost kyslíku, teplota, pH apod.) růst se označuje jako exponenciální nebo logarit-

mický (růstová rychlost je stálá a počet buněk stoupá.) [41]. Při kultivaci MO přibývá nejvíce těch buněk, které mají vyšší specifickou růstovou rychlost (přirozená selekce buněk). Současně růst MO způsobuje změny v prostředí, klesá koncentrace limitujících živin, stoupá počet buněk na jednotku objemu (zakalení roztoku), mírně narůstá teplota, mění se koncentrace rozpuštěného kyslíku. [41], [20] Všechny takovéto změny mají za následek snížení růstové rychlosti. Následovat tak může fáze stacionární, případně fáze odumírání.

Velký vliv má hodnota průtoku, která způsobuje vyředění disperzní populace MO (období kolem 1.11.2008, absorbance v bioreaktoru BA téměř nulová). Jelikož však v této době nedošlo ke snížení účinnosti procesu (hodnoty CHSK neměnné), převzaly funkci degradačních procesů imobilizované frakce MO.



Obrázek 38 - Průběh absorbance v bioreaktorech KR, BA, a další průběhy s tím související

Růst MO však nenastává okamžitě po přenosu buněk do prostředí bohatého na živiny. Bezprostředně po přenosu do čerstvého média se buňky nedělí, ale pouze se adaptují na nové podmínky a postupně přijímají živiny z prostředí (lag-fáze). Počet buněk během ní nestoupá, ale zůstává stejný (Obrázek 38 v průběhu několika prvních týdnů). Adaptační čas je ovšem ovlivněn řadou faktorů jako jsou podmínky, ve kterých buňky žily dříve, množství biomasy, která byla přenesena, teplota, typ substrátu aj.).

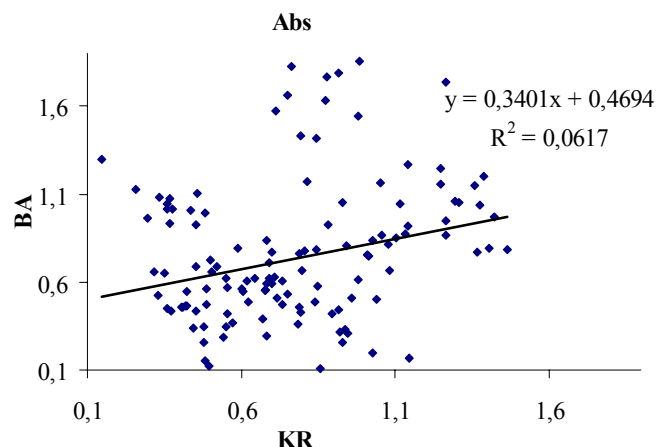
V reálném systému tak téměř nikdy nemůže nastat rovnovážný stav (jak tomu je například na *Obrázek 21 – Ideální průběh kultivace směsi v bioreaktoru [38]*, strana 55). Tento princip je podstatou tzv. samoregulační schopnosti bakteriální kultury. Buňky tak během svého života v prostředí procházejí různými fyziologickými stavy odrážející momentální stav prostředí. Jednoduchým příkladem je tvorba pěny na hladině kultury v reaktoru. Pěna se vytváří v závislosti na bakteriální populaci a stavu daného degradujícího organismu. V experimentu s bakterií *Rhodococcus* se tvořila pěna zejména v úvodních stádiích kultivace (především při semikontinuální kultivaci, kdy byl dodáván pouze anilin). Zmizela během následné kontinuální kultivace s reálnou odpadní vodou. To znamená, že změna kvality prostředí (vnějších a vnitřních podmínky systému) ovlivní stav MO. Výsledkem je například transformace stavu buněčné stěny (změna tloušťky buněčné stěny a jejího rozdílného složení).

Kromě růstu mikroorganismů dochází při kultivaci i k jejich přirozenému odumírání, a to jak stárím, tak z důsledku extrémních stavů reaktoru (MO nemohou za daných podmínek v systému přežít). Dochází tak k zastavení degradace dané látky. Těsně než tato situace nastane, nachází se systém na svém maximálním limitním zatížení. Vypozorovat tuto hranici bylo cílem této práce. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v závěru. Příčinou ztráty biodegradability tak může být například:

- Extrémní koncentrace toxické látky, nemůže tak dojít k množení MO.
- Živiny nutné pro růst mikroorganismů jsou v příliš nízké koncentraci.
- Samotný polutant (jako zdroj uhlíku) může být v tak nízké koncentraci, že vylučuje růst a množení mikroorganismů.
- Substrát není v takové formě, která by byla dostupná pro mikroorganismy, například sraženiny
- Vysoká teplota, nízká doba zdržení, extrémní hodnoty pH, O₂, aj.

Z naměřených dat v průběhu celého roku byla vynesena závislost $BA = f(KR)$. Následující graf (*Obrázek 39*) porovnává, jak moc jsou si posuzované technologie podobné. Uvedená statistická vypočítací schopnost (posuzovaná dle R^2) dokládá naprostou nestejnorodost obou systémů. Použité technologie (KR – komerční nosič AnoxKaldnes, BA – nanovláknový nosič) tak mají vliv nejen na tvorbu biofilmu, ale mají také vliv na bakteriální populaci v médiu, které tak musí soupeřit s imobilizovanými MO o substrát. Tvrzení potvrzují mírně nižší hodnoty absorbance u technologie BA, což potvrzuje lepší zapracování a kolonizaci nosiče a vyšší aktivitu MO vázaných na nosič ve formě biofilmu.

Grafickým znázorněním ideálního procesu růstu MO je růstová křivka (*Obrázek 40*). V kontinuální kultivaci se však takového průběhu nikdy nedosáhne. Neboť do reaktoru stále přichází substrát i živiny (nerovnoměrně), a tak se stále mění podmínky na které se musí MO opět adaptovat.



Obrázek 39 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty absorbance



Obrázek 40 - Růstová křivka [20]

9.6.2 Sušina

Další způsob stanovení přírůstku bakteriální populace, tentokrát MO vázané na daný nosič ve formě biomasy, je měření sušiny biofilmu.

Koncentrace buněk (měřena výše jako optická densita) odráží dělení a množení buněk. V principu se mění s časem nespojitě, protože může nabývat jen celočíselných hodnot. Koncentrace biomasy (měřeno jako sušina) však vystihuje především růst buněk a mění se spojitě s časem. Při vsádkové kultivaci, bychom při měření množení bakteriální populace (OD) a růstu (sušina) najednou oběma parametry získali dvě křivky, které by byly na vodorovné ose časově posunuty, protože buňka nejdříve roste a potom se dělí [46], [41]. Bohužel biomasa na nosiči nebyla měřena tak často, abychom mohly tento charakter potvrdit, především z důvodu malého počtu nosičů v kultuře, jejichž množství by se tak velice rychle snižovalo.

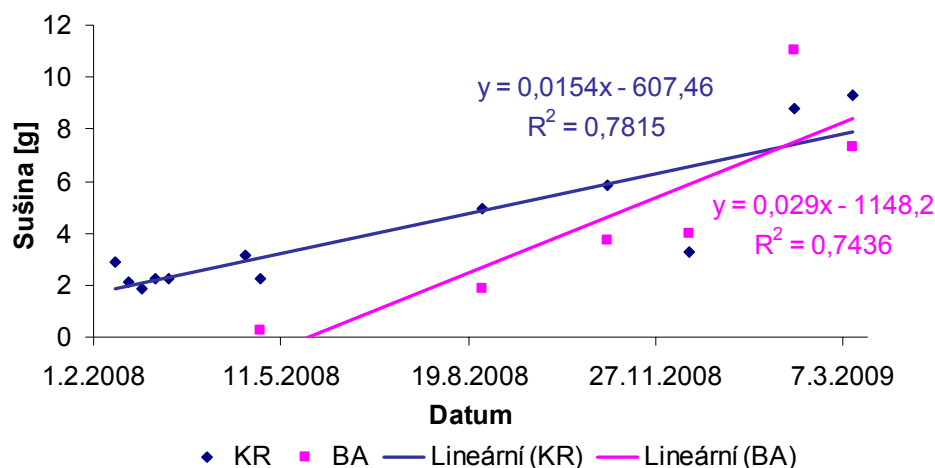
Množství vytvořené biomasy je přímo úměrné množství spotřebovaných živin. (rychlost spotřeby živin je přímo úměrná koncentraci biomasy). Aktuální hodnoty jsou za různých okolností různé. Informují o změnách vyvolaných ve fyziologii bakteriální buňky změnami podmínek růstu. [46], [41]

Kinetika tvorby biofilmu je určena rychlostí mikrobiálního růstu a procesy opětovného odpoutávání buněk z nosiče zapříčiněnými průtokovou rychlostí a kolizí částic biofilmu. Oba tyto procesy musí být navzájem v rovnováze, aby nedocházelo k destrukci biofilmu nebo k zanášení bioreaktoru [15].

Daný nosič (KR, BA) byl nejprve důkladně vysušen (1 hodina při 105 °C) a zvážen. Odstranění biofilmu probíhalo máčením v kyselině chromsírové (16 hodin), opět následovalo sušení nosiče. Sušina populace vázané na nosič byla stanovena z rozdílu hmotnosti nosiče po dané době kultivace a původního (panenského) nosiče. Výsledná hmotnost biomasy jednoho nosiče byly přepočtena na biomasu na litr (dle daného počtu nosičů, při plnění reaktoru 30 %). V reaktoru KR se nachází 41 kusů nosičů (na dva litry), v reaktoru BA jest 17 kusů nosičů (na dva litry).

Jelikož byl komerčně dostupný nosič AnoxKaldnes (KR) kolonizován již při vložení do reaktoru (prvotní kolonizace probíhala v podniku Draslovka Kolín), je nárůst biomasy na počátku měření roven cca. 1 g/l. Nanovláknenný nosič (BA) byl při aplikaci do reaktoru zcela původní, bez kolonizace, proto křivka probíhá od nulových hodnot. Data nárůstu biomasy byla proložena lineární funkcí, která tak přehledněji popisuje danou fázi růstové křivky kolonizace MO na nosiči.

Obě technologie lze porovnat, dle doby, jakou trvá nárůst daného množství biomasy. Pro technologii (KR – AnoxKaldnes) dostaneme, že rozdíl hmotnosti biomasy z hodnoty 1 g/l na hodnotu 4 g/l proběhne za čas 362 dnů. Pro technologii (BA – nanovláknenná technologie) je rozdíl hmotnosti biomasy z hodnoty 1 g/l na hodnotu 4 g/l proběhne za čas 167 dnů. Výsledek tak potvrzuje domněnku, že kolonizace nanovláknenné vrstvy může probíhat daleko rychleji. Dle výpočtu dokonce více, jak dvakrát rychleji. Zejména v úvodních fázích kolonizace, což potvrzuje také obrazové hodnocení biofilmu (kapitola 9.6.3.1).



Obrázek 41 - Stanovení celkové sušiny v bioreaktorech KR, BA

Přirozeně nelze očekávat, že růst biomasy bude pokračovat do nekonečna. Uvedený graf je pravděpodobně počátečním úsekem tzv. lag-fáze, která se ustálí na konečné hodnotě. Limitní hodnota je dána především užitou technologií. Graf dokládá dlouhou dobu zpracování nosiče.

9.6.3 Obrazové hodnocení biofilmu

Další způsob stanovení biomasy na nosiči je sledování nárůstu biofilmu, které v této práci probíhá mikroskopickým pozorováním v průběhu několika prvních týdnů kolonizace. Vyhodnocování je prováděno obrazovou analýzou v programu Matlab.

Bohužel i toto hodnocení je zatíženo velkou chybou, neboť nárůst MO počíná na krystalech soli, které povrch nosiče kolonizují jako první. *Obrázek 42* dokazuje vysokou rezistenci MO *Rhodococcus* k extrémní salinitě odpadní vody. Bílé jsou zachyceny solná ložiska, hnědá barva zobrazuje počínající nárůst kolonií MO (14 dní kolonizace), šedá barva je podložní nosná matrice, v tomto případě komerční nosič AnoxKaldnes. Další velkou chybou v procesu vyhodnocování nárůstu kolonií je opomenutí možnosti MO růst nejen po nosiči (plošně), ale i směrem od něho (objemově,). Toto hledisko v této práci zhodnoceno není, v navazující analýze se s ním však již počítá.



Obrázek 42 - Nárůst biofilmu na solné podložní matrici

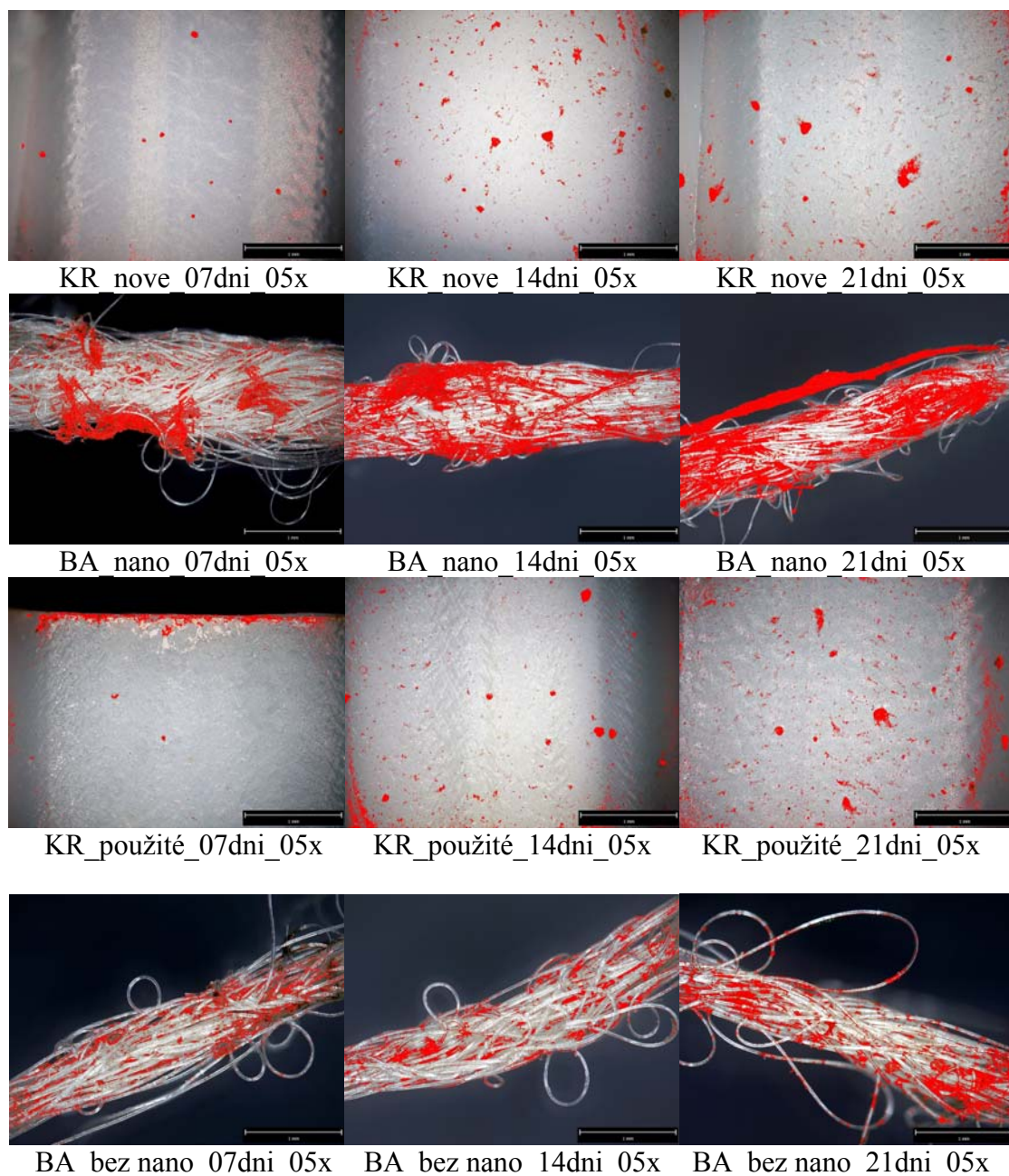
Zcela korektním přístupem by tak bylo nejprve odstranit biomasu z nosiče do daného objemu tekutiny (využitím ultrazvuku). Následně pak stanovit počet buněk v tomto roztoku, například pomocí počítačící komůrky, či opět obrazovou analýzou. Tento postup nebyl během práce dokončen.

9.6.3.1 Obrazová analýza kolonizace nosiče mikroorganismy

V oblasti analýzy obrazu jde především o vyjmutí důležitých informací z dat, která jsou ve formě obrazů. Analýza obrazu tak přispěje k hodnocení bakteriálních populací, které bývají zachycovány optickým mikroskopem. Cílem je zcela automaticky identifikovat (dále také spočítat a měřit MO) v takovýchto obrazech. Automatizace postupu pomocí výpočetních programů také předejde neobjektivnímu hodnocení pozorovatele a velice usnadní jeho práci. Smyslem této kapitoly je obrazová analýza nosičů - PE nosiče AnoxKaldnes (KR) a PP nanovlákná (BA). Hlavním požadavkem je stanovení nárůstu kolonií (obsazenost povrchu v průběhu kolonizace), v závislosti na typu nosiče a jeho vlastnostech. Případně mohou být zvažovány další požadované okolnosti, které by mohly inhibovat bakteriální růst či jejich množení, což by mělo přispět k optimalizaci daných technologií.

Na následujících několika obrázcích (souhrnně pod označením *Obrázek 43*) je zachyceno mikroskopické pozorování nosičů v průběhu prvních tří týdnů kolonizace. Fotografie jsou uvedeny pouze jen jako ilustrace, kde červené zbarvení na obrázcích představuje mikrobiální biofilm. Všechny fotografie jsou pořízeny ve stejném zvětšení a za stejných podmínek (měřítko uvedené vpravo dole je 1mm).

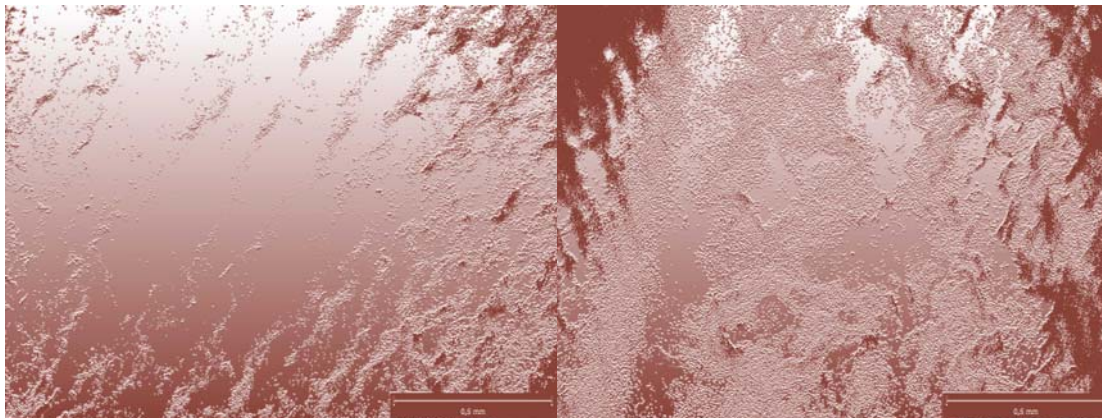
Po naočkování buněk do média dojde v době dnů až týdnů (v závislosti například na koncentraci buněk) k tomu, že se buňky v roztoku rychle rozmnoží. Jejich vysoká schopnost adheze k povrchu materiálů umožňuje kolonizovat v podstatě libovolný materiál. Ke stanovení koncentrace MO v roztoku byla užita optická densita. Jelikož bylo k adaptaci MO využito anilinu, který silně obarvuje médium, je hodnocení nárůstu dispergovaných bakterií znehodnoceno (počáteční hodnota OD činila 0,3, v průběhu týdne vzrostla na 1,1 – měřeno s uvedenou chybou).



Obrázek 43 - Obrazové zachycení časového vývoje kolonizace daných nosičů

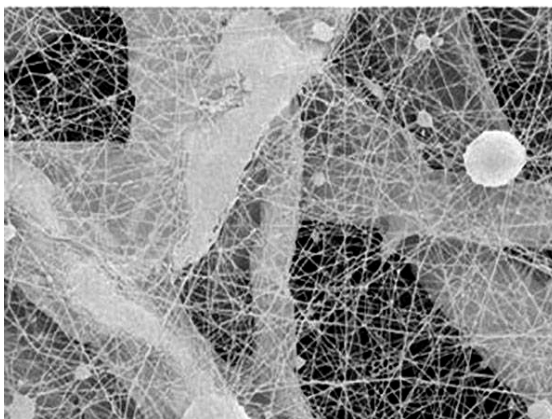
Polyethylenové nosiče AnoxKaldnes (KR) jsou nejprve osázeny krystalky soli, na nichž se teprve poté usazují první kolonie MO. Solné krystaly poskytují MO svou charakteristickou strukturou pravděpodobně daleko větší specifický povrch a vyšší adhezi. Nevýhodou KR nosiče je také, že MO musí před kolonizací narušovat jeho povrch, možná i proto kolonizují prvně zasolená místa. Do reaktoru tak byly vloženy

také nosiče, které byly předem kolonizovány (biofilm byl však odstraněn), a to z důvodu sledování, zda má vliv předem rozrušený povrch na možnosti kolonizace. Nekolonizovaná povrchová vrstva tak byla také mikroskopována, dokumentuje *Obrázek 44*, na nějž byly dodatečně uplatněny dané filtry zvýrazňující koncepci obrazu (v tomto případě jeho pórovitost).



Obrázek 44 - Mikroskopické pozorování povrchu nosiče KR - původní a použité

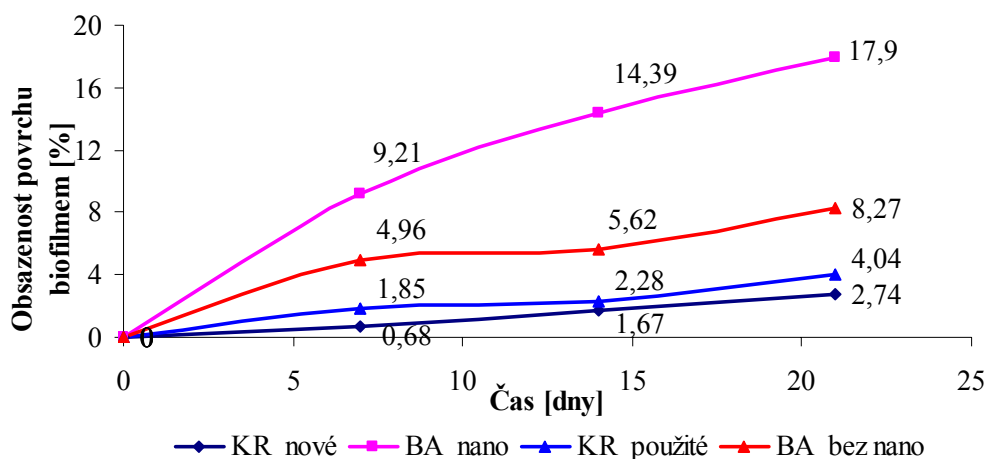
Nanovláknenné nosiče mají v tomto směru neskutečnou výhodu. MO usedají bezprostředně na nanovláknenné vrstvy, které jsou pro ně dostatečně drobné (*Obrázek 45*). MO tak nemusejí nikterak narušovat svrchní vrstvu a narůstají tak přímo na povrchu, bez nutné přítomnosti „zasolených“ míst. Otázkou by také mohlo být, zda je skutečně důležitá přítomnost nanovláknenné vrstvy. Po delší době kolonizace se mikrobiální biomasa přirozeně rozroste i na místa bez nanovláken, jenž přirozeně nepokrývá celý povrch nosiče.



Obrázek 45 - Mikroskopické pozorování povrchu nosiče BA s prvotní kolonizací MO [48]

Pomocí obrazové analýzy a jejího vyhodnocení plynou z *Obrázek 43* a grafu na *Obrázek 46* následující závěry.

Na **polyethylenových nosičích** AnoxKaldnes (KR) se bakteriální biofilm uchycuje velice pomalu. Tento pomalý nárůst je zapříčiněn nedostatečnou adhezí MO k povrchu nosiče. Mírně lepších výsledků vykazují předem kolonizované nosiče, kde bakterie nemusí vynakládat energii a čas k narušení povrchu a téměř okamžitě jej tak mohou kolonizovat. Ovšem rychlost nárůstu není ani zde příliš vysoký. Výsledek tak dokládá, že i pro totožný typ nosiče lze dosáhnout předúpravou jeho povrchu (narušením svrchní vrstvy například v kyselině) vyšší schopnosti kolonizace mikroorganismy. Po delší době kolonizace se mikrobiální biomasa přirozeně rozroste i na nezasolená místa (například *Obrázek 48*).

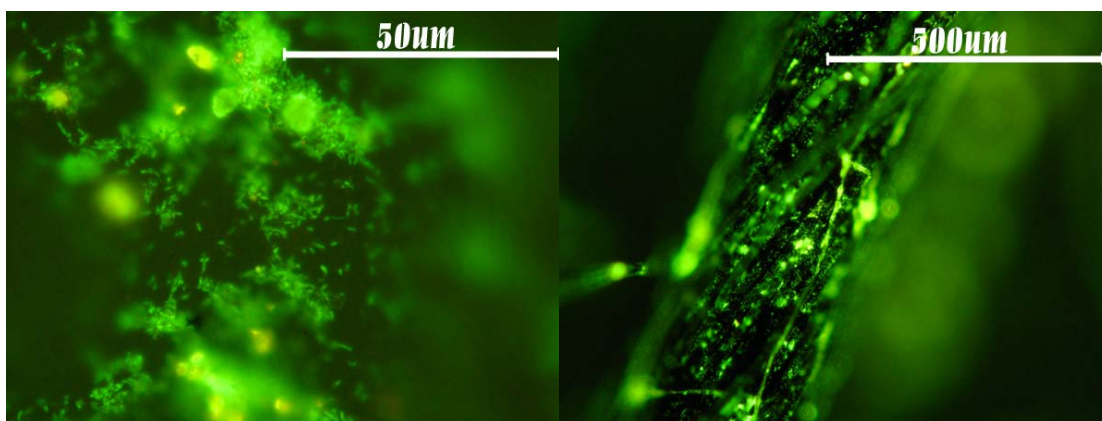


Obrázek 46 - Obrazová analýza nárůstu biofilmu

Nanovláknenné nosiče mají v tomto směru neskutečnou výhodu. MO usedají přímo na nanovláknenné vrstvy. Přítomnost těchto vrstev je nezbytnou součástí pro rychlou kolonizaci. *Obrázek 46* dokládá, že sférické nosiče bez nanovláknenné vrstvy (BA_bez nano) jsou svým průběhem nárůstu biofilmu až dvakrát výhodnější než komerční technologie AnoxKaldnes (KR). Daleko výraznějšího růstu MO na nosiči vykazují sférické nosiče s využitím nanovrstvy (BA_nano), na nichž biomasa usedá dokonce až více jak šestkrát lépe. Po delší době kolonizace se mikrobiální biomasa přirozeně rozroste i na místa bez nanovláken.

Výše uvedené výsledky však nemají dostatečnou vypovídací schopnost, neboť fotografován byl vždy jen jeden nosič z reaktoru (nízký počet nosičů v reaktoru vyšší počet nedovoloval). Výsledky jsou tak zatíženy velkou systematickou chybou. V dalším vyhodnocení bude užito například i statistického a pravděpodobnostního vyhodnocení.

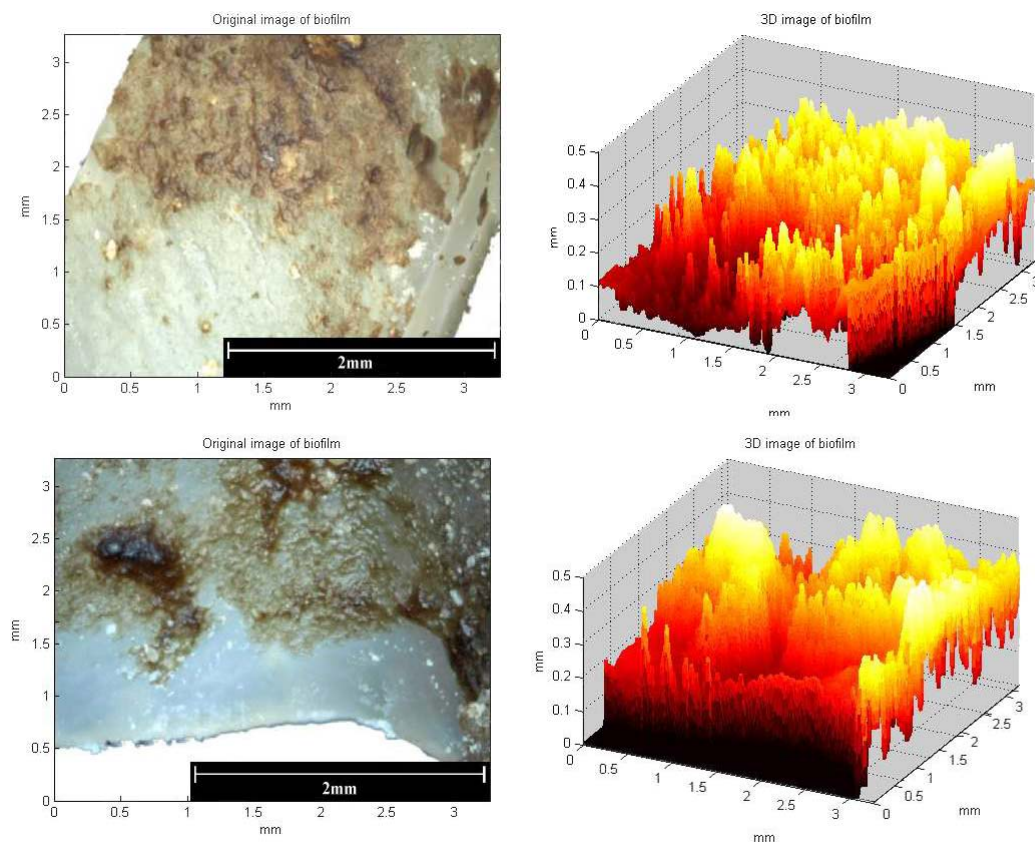
V době již dostatečně porostlého nosiče byly pořízeny snímky z pozorování pod fluorescenčním mikroskopem (*Obrázek 47* – fotografie pořízena na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, ústavu kvasné chemie a bioinženýrství).



Obrázek 47 - *Rhodococcus* na plastovém nosiči (KR, vlevo), *Rhodococcus* na nanovláknenném nosiči (BA, vpravo), foto Kruliková, VŠCHT

Fotografie potvrzují dobrou kolonizační schopnost MO k danému typu nosiče. MO kopírují především místa s nanovláknennou vrstvou, časem se rozrůstají i mimo tuto plochu a zaplňují míst po celém nosiči.

Velice zajímavý pohled na nárůst biofilmu na nosiči po dostatečné době kolonizace (zde například cca. 12 měsíců) poskytuje jasový profil obrazu, který je následně převeden na „3D“ pohled, a to využitím matematického programu Matlab.



Obrázek 48 - Jasový profil nárůstu biofilmu, ve formě „3D“ obrazu

9.7 pH

Růst mikroorganismů je významně ovlivňován koncentrací vodíkových iontů v prostředí, extrémní alkalita či acidita prostředí tak má značný vliv i na rychlost degradace. Pro mikrobiální aktivitu jsou obecně nepříznivé extrémní hodnoty pH (vesměs nižší jak 5 či převyšující 10). Ideální stav pro bakteriální růstu (rodu *Rhodococcus*) se nachází v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí (rozmezí 6 až 8). Při hodnotách pH vzdalujících se od optima, klesá odolnost mikroorganismu k teplotě [20]. Nejvhodnější hodnoty optimálního pH jsou specifické daným místem, charakterem kontaminace, využitým organismem aj. Pokud je tedy daný MO uzpůsobený k životu při pH 8, jak je tomu u rodu *Rhodococcus*, pak každá změna může inhibovat degradační aktivitu. Jestliže však změnu hodnoty pH způsobily vnější podmínky, je jeho úprava nezbytná.

Hodnoty pH mají také vliv na rozpustnost a následně i biodostupnost některých kontaminantů. Toho lze využít v případě in-situ, kde se na kontaminovaném místě vyskytují látky toxické pro degradující mikroorganismy. Zvýšením pH může být redukováno riziko poškození působícího mikroorganismu (například toxické kovy jsou nerozpustné při vyšších hodnotách pH).

Pro co nejpresnější měření hodnot pH ve vodném prostředí bioreaktorů byla použita kombinovaná skleněná elektroda (měrný člen pro měření elektrického potenciálu). Jako referentní elektroda je v tomto případě využita argentchloridová srovnávací elektroda. Obě elektrody jsou umístěny v ochranném plastovém pouzdře. Pro základní popis metody měření pH sondou, lze přejít na stránku v literatuře [49]. Vyhodnocovacím zařízením byl měřicí přístroj WTW Multi 350i [50].

Změny pH byly důkladně monitorovány. Rapidní změny o 1 či 2 jednotky mohou inhibovat mikrobiální aktivitu a může trvat dlouhou dobu než se mikroorganismy aklimatizují a opět se stanou aktivními. Jako zdroj živin byla přidávána kyselina fosforečná, 100x ředěná, jelikož se však jedná o velice slabou kyselinu, nepředpokládáme tak jakýkoli vliv na možný pokles hodnot pH, navíc OV má velkou pufrační kapacitu. Vzhledem k možnosti vytěkávání kyanidů je vhodné pH udržovat v oblasti neutrální či lehce zásadité. V bioreaktorech (označení KR, BA) byla tato hodnota zcela autonomně udržována v rozmezí 7,4 – 8,8.

Hodnoty pH jsou také nepřímo závislé na teplotě. S rostoucí teplotou klesá pH, až o 1 jednotku pH se změnou teploty z 0 °C na 100 °C (disociační konstanta K_W je závislá na teplotě, pro nižší teploty výrazněji než pro vyšší, předpokládán stálý atmosférický tlak) [51]. V reaktorech tak lze při regulované změně teploty z 10 °C na 40 °C, očekávat snížení pH z hodnoty cca. 8,26 na 7,77, k čemuž skutečně dochází (1.6.2008 až 1.9.2008 a následně také 1.1.2008 a dále).

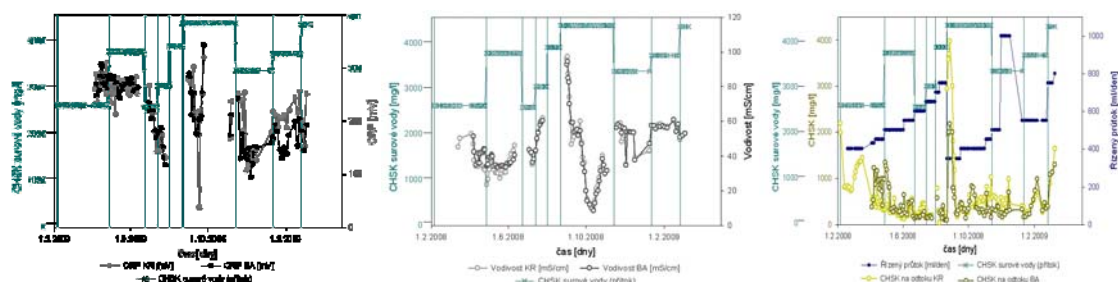
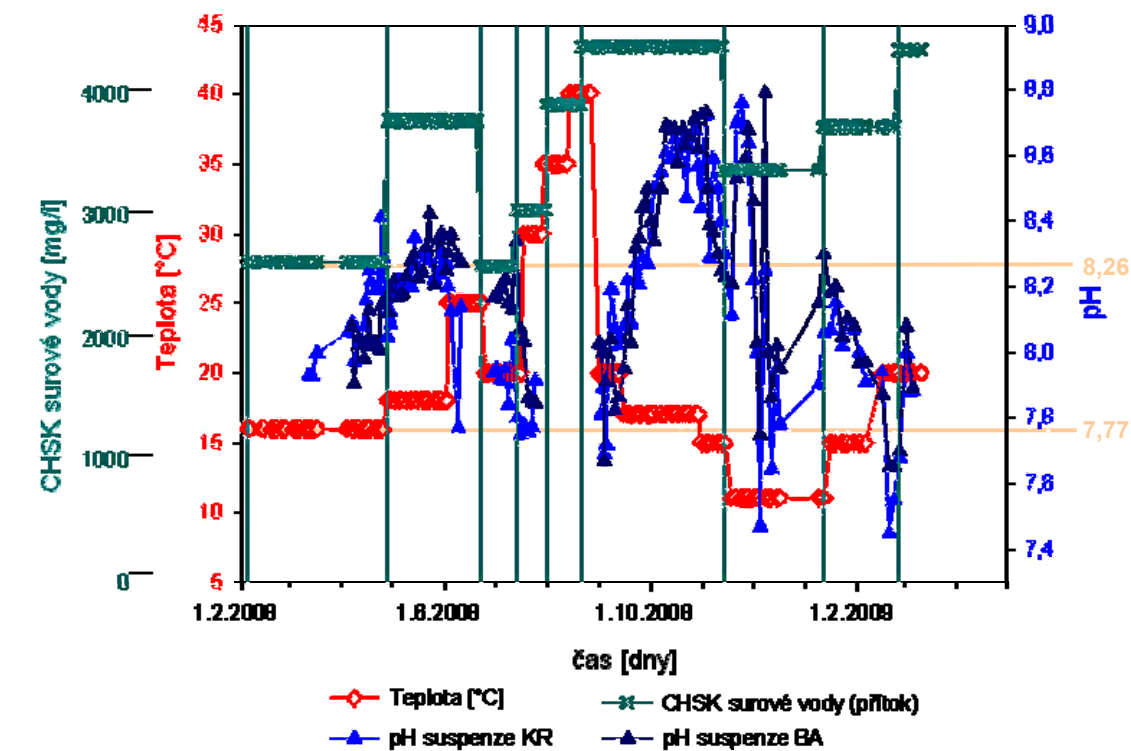
Další nárůst hodnoty pH mimo tuto oblast (7,77 – 8,26), tedy období kolem 1.10.2008, může být zapříčiněn vysokou hodnotou pH přítokové surové vody. Surová OV je v podniku regulována na hodnotu pH = 7 (dle bodových měření na CHBČOV Draslovka Kolín se může pohybovat v rozmezí 1,31 až 12,15 pH).

Případně může být tento výkyv (mimo 7,77 – 8,26) způsoben vysokým obsahem rozpuštěných solí v přitékající surové OV (vyšší salinita způsobí nižší pH, *Obrázek 51*). Měřená vodivost surové OV v období kolem 1.10.2008 činila 100mS/cm (cca. 64 g soli/l). Výsledkem přítoku takto extrémně zasolené surové vody je snížení hodnoty pH, a následná adaptace MO k této vysoké salinitě. Adaptace MO může způsobovat snížení obsahu solí ve roztoku (přejdou do nitra MO). Hodnota pH vody, kterou měříme se opět navyšuje (snížení obsahu solí v roztoku způsobí nárůst pH).

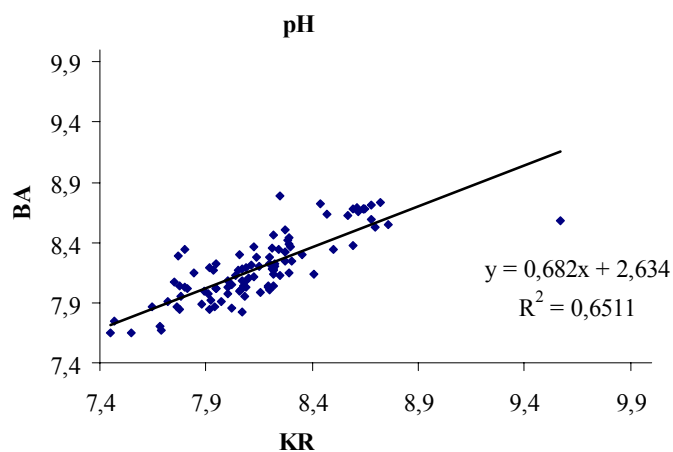
Zcela výjimečně by odklon mimo rozmezí (7,77 – 8,26) mohlo ovlivňovat složení surové OV, zejména obsah organických látek v OV (v tomto období činila surová voda 4325 mg/l CHSK, v grafu vedlejší, levá, y-ová osa), ačkoli její přítok byl velice nízký (400 ml/den – doba zdržení 5 dní).

Průměrná hodnota pH pro celoroční pozorování pro nosiče AnoxKaldnes (KR) činí 8,146, kdežto pro nanovláknenné nosiče (BA) je tato hodnota 8,189. Rozdíl je zcela zanedbatelný. Momentální rozdíly mohou být způsobeny například vyšším obsahem koncentrace amonných iontů (bioreaktor s BA nanovláknennými nosiči). Vyšší obsah těchto iontů je způsoben masivnějším rozkladem dusíkatých látek, to může také způsobit nižší CHSK v reaktoru (k čemuž skutečně došlo, viz. kapitola 9.2 CHSK).

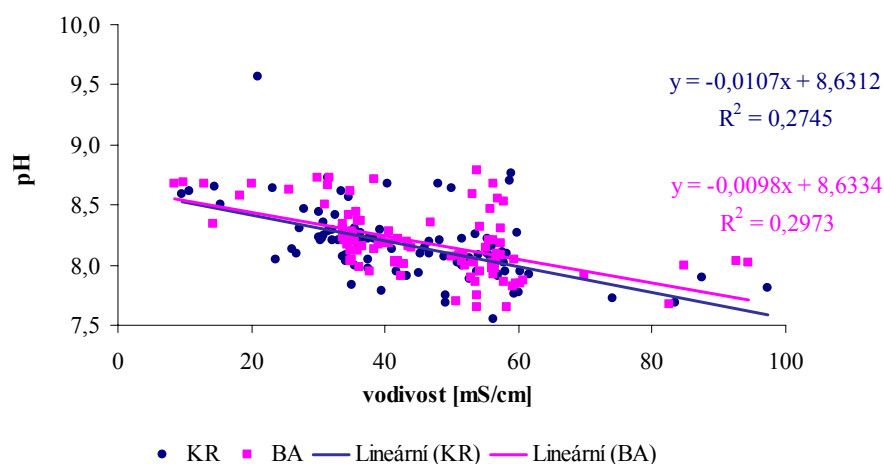
Z naměřených dat uvedených výše byla vynesena závislost $BA = f(KR)$. Následující graf, *Obrázek 50 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty pH*, porovnává, jak moc jsou si posuzované technologie blízké. Z uvedeného grafu vyplývá, že nově vyvíjená technologie (BA) nemá negativní vliv na hodnotu pH OV. Obecně je pro srovnání podmiňující shodné látkové zatížení.



Obrázek 49 - Průběh pH v bioreaktorech KR, BA, a další průběhy s tím související



Obrázek 50 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty pH



Obrázek 51 - Korelace dat pH, vodivost pro KR, BA

9.8 Konduktivita, vodivost

Elektrolytická konduktivita (konduktivita, měrná elektrolytická vodivost) je míra koncentrace ionizovatelných anorganických a organických součástí vody. Je jedním ze základních parametrů kvality a použitelnosti vody. Hodnota konduktivity je měřítkem úhrnné koncentrace iontů v měřeném roztoku. Zprostředkovaně je to informace o celkovém obsahu rozpuštěných, disociovaných látek (solí), disociovaných kyselin a zásad [52], o součtu tvrdosti (Ca, Mg), případné alkality (Na, K) [42]. Jednotkou je [S/m]. V analytice vody se obvykle využívá jednotky [mS/cm].

Pro měření konduktivity je užitá dvouelektrodová vodivostní platinová elektroda v ochranném plastovém pouzdře. Přístroj WTW Multi 350i měří odpor protékající vody tak, že elektrodami prochází střídavý proud, jež se vzápětí převádí na stejnosměrné napětí odpovídající jednotkám μS . Výsledek měření kompenzuje teplotní potenciometr. [42]

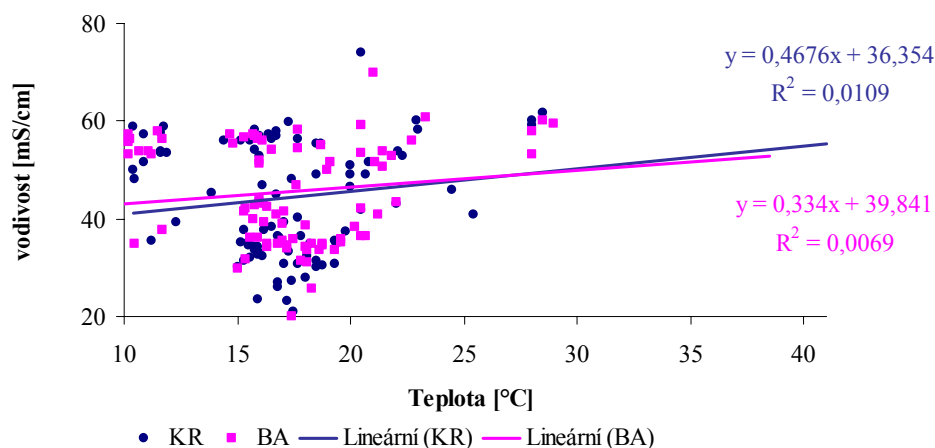
Vodivost je ve zředěných roztocích lineární funkcí koncentrace iontů, závisí však také na jejich nábojovém čísle, pohyblivosti a teplotě prostředí. Vzrůst nebo pokles teploty o 1 °C způsobuje změnu konduktivity o 2 % [52], ilustruje *Obrázek 52*. Kde změna teploty je 30 °C, tudíž lze očekávat nárůst vodivosti o 60 % (z hodnoty cca. 40 mS/cm k hodnotě 64 mS/cm). Ačkoli se v reálných modelech nejedná o zředěný roztok, měření tuto změnu hodnoty vodivosti potvrzuje.

Měření vodivosti může být rušeno nerozpuštěnými látkami [34]. Obsah těchto látek v reaktoru s nosičem AnoxKaldnes (K) a nanovláknenného nosiče (B) dokládá *Tabulka 21*.

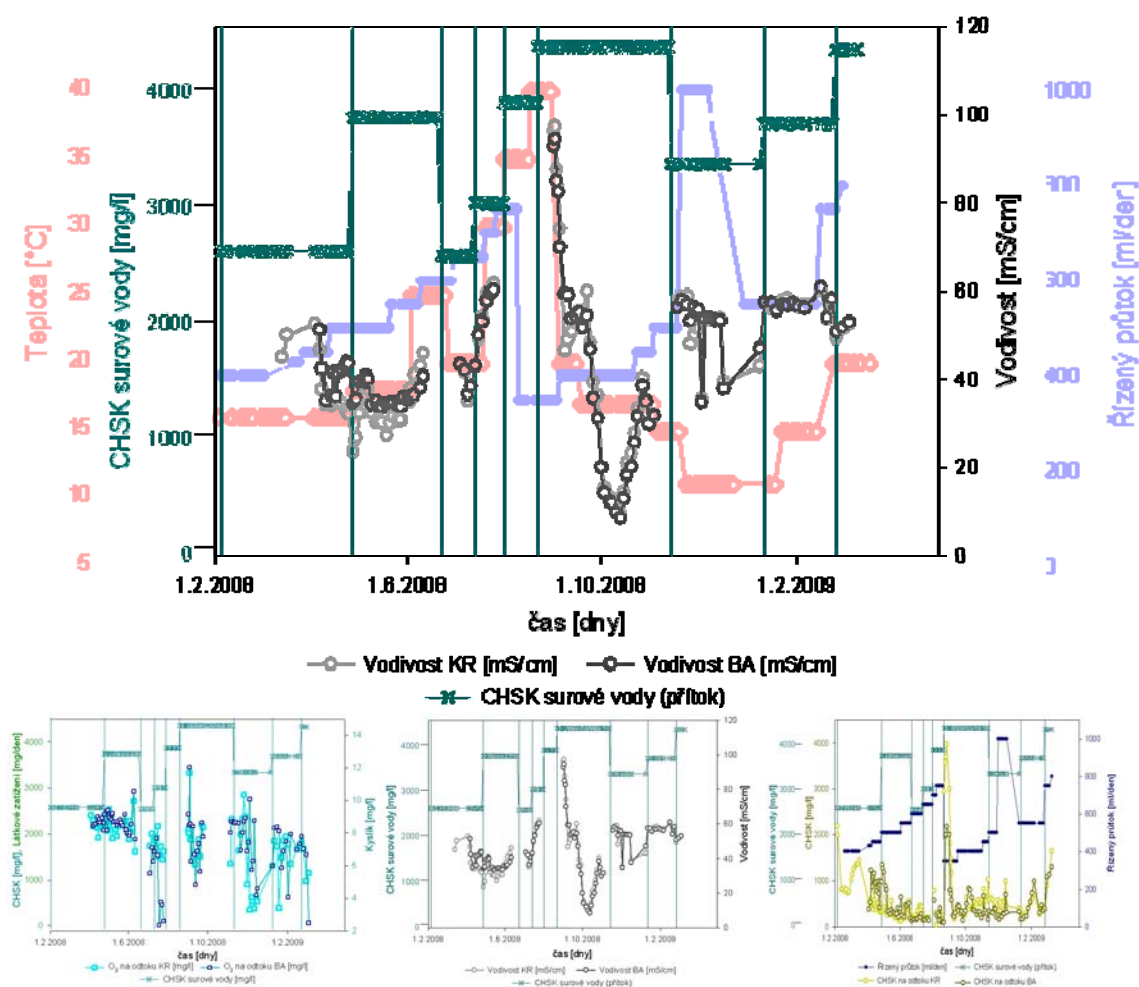
Tabulka 21 - Obsah nerozpuštěných látek v bioreaktoru KR, BA, ke dni 10.12.2008

Ukazatel		KR	BA
NL 105 C (20.11.08)	[mg/l]	516	43,6
NL 105 C (10.12.08)	[mg/l]	270	116

Průměrná hodnota NL surové vody je 152 mg/l (dle měření Draslavky Kolín). Hodnota vodivosti v reaktorech v tento den činila 53 mS/cm.



Obrázek 52 - Korelace dat vodivost, teplota pro KR, BA



Obrázek 53 - Průběh vodivost v bioreaktorech KR, BA, a další průběhy s tím související

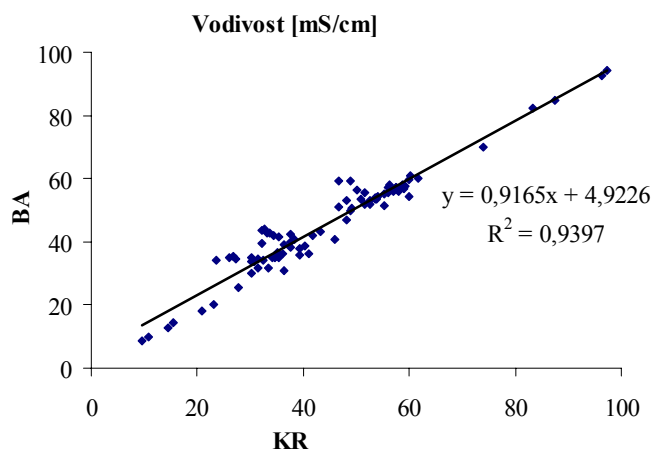
Z naměřených dat v průběhu celého roku byla vynesena závislost $BA = f(KR)$. Následující graf (Obrázek 54) porovnává, jak moc jsou si posuzované technologie podobné. Z uvedeného grafu vyplývá, že rozdíl mezi technologiemi je bilančně logicky velice zanedbatelný. Ačkoli se může zdát, že na nanovlákněném nosiči ulpívají solné krystaly v daleko větší míře (kapitola 9.3 *Teplota*, strana 64), nemá to žádný vliv na konduktivitu v roztoku, a tak ani na MO v suspenzi. Extrémní hodnoty vodivosti mohou inhibovat MO (vysoké, či extrémně nízké). Pokud se tedy MO již na vysoce slanou

vodu adaptují, není následně vhodné radikálně měnit tyto podmínky (uměle snižovat obsah solí).

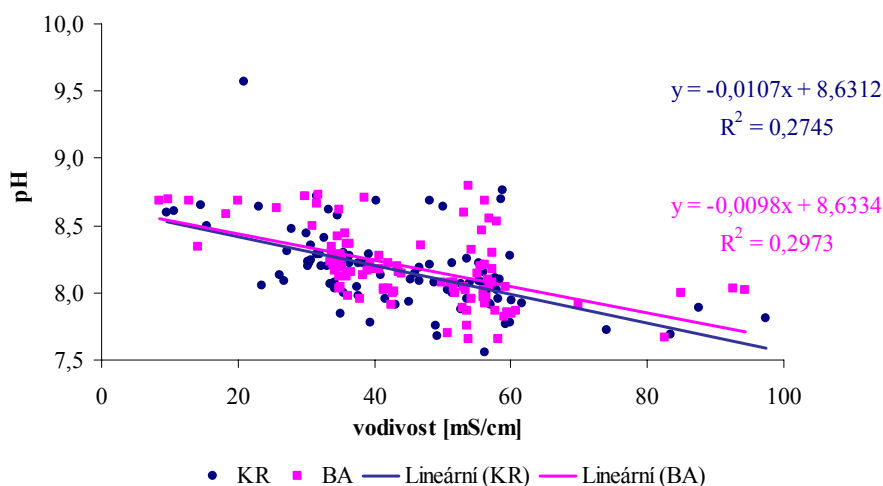
Rostoucí vodivost, neboli vyšší koncentrace iontů v měřeném roztoku způsobuje pokles pH. Korelaci mezi naměřenými daty dokládá *Obrázek 55*. S rostoucí vodivostí klesá hodnota pH.

Vysoká salinita má také nejspíše vliv na počáteční kolonizaci MO (*Obrázek 42*). Neboť vysoká adhesivita solí k povrchu nosiče způsobuje uplívání solí na povrch nosiče. Na těchto solných vrstvách se již MO vyskytují (vyšší adhesivita MO k solím než k plastovému nosiči). MO kolonizují nejprve povrch solí a odsud se dále rozšiřují na povrch samotného nosiče. Výhodným přístupem je proto využití nanovlákněné vrstvy, kde MO „nemusejí čekat“ na usedání solných krystalků a ulpívají přímo na nanovrstvě.

Abychom alespoň částečně eliminovali vliv vysoké salinity na rychlost biodegradace, byl v reaktorech doplňován odpar vody (přidávána odstátá voda z důvodu nižšího obsahu chloru). Biogenní podmínky v reaktoru tak zůstávali pro tento parametr stejné.



Obrázek 54 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty vodivosti



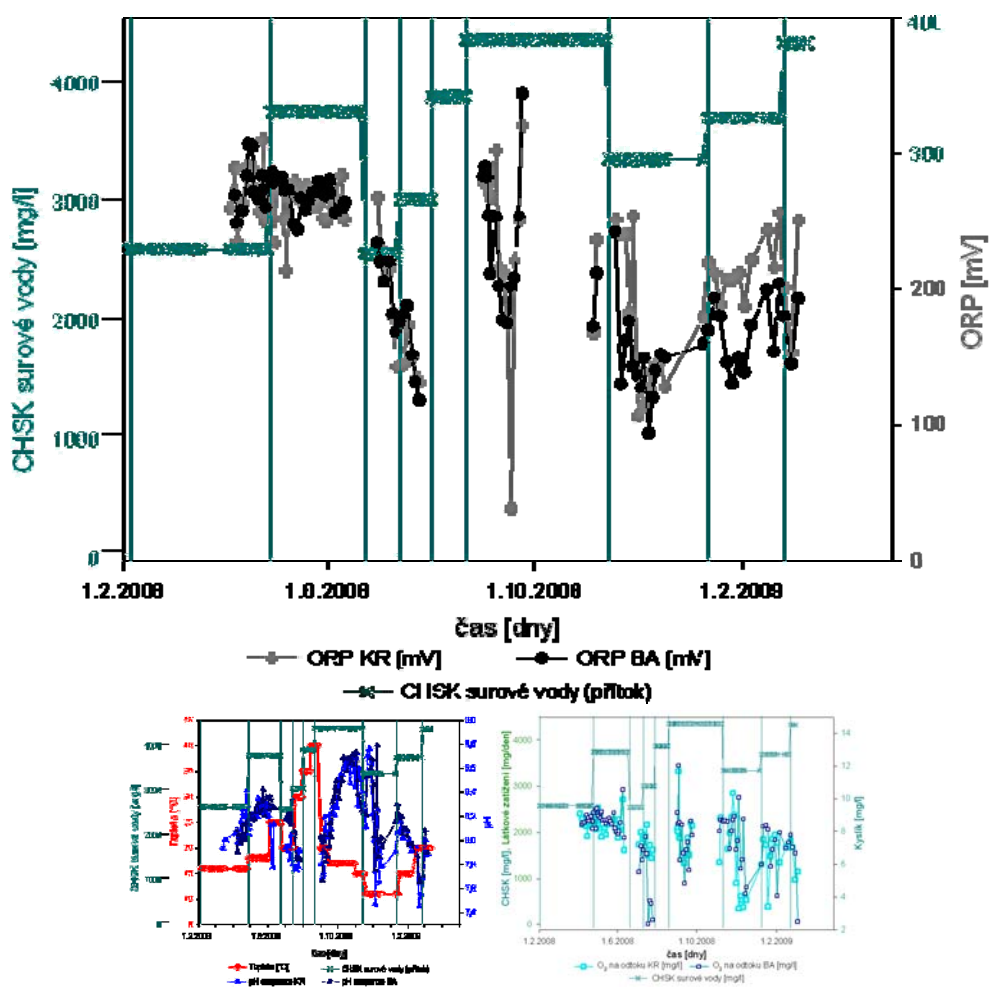
Obrázek 55 - Korelace dat pH, vodivost pro KR, BA

9.9 ORP

Oxidačně-redukční potenciál charakterizuje probíhající oxidačně redukční procesy ve vodách, závisí především na hodnotě pH prostředí a obsahu rozpuštěného O_2 . Jelikož biodegradace polutantů za využití MO je oxidační proces (jako akceptor elektronů⁵ se využívá kyslík), musí se hodnota ORP v průběhu měření nacházet v oxické oblasti (kladné hodnoty ORP). [33]

Pro měření ORP jsou dodávána kovová čidla s platinovou měrnou elektrodou a s argentochloridovou referenční elektrodou, nacházející se v ochranném skleněném pouzdře. Nutností je hodnotu standardizovat (obecné srovnávání potenciálů) k vodíkové elektrodě, jejíž potenciál je při všech teplotách roven nule. Proto se k naměřené hodnotě ORP musí přičíst potenciál referenční elektrody proti standardní vodíkové elektrodě, ten jest +220 mV (pro přístroj WTW Multi 350i a danou sondu) [50].

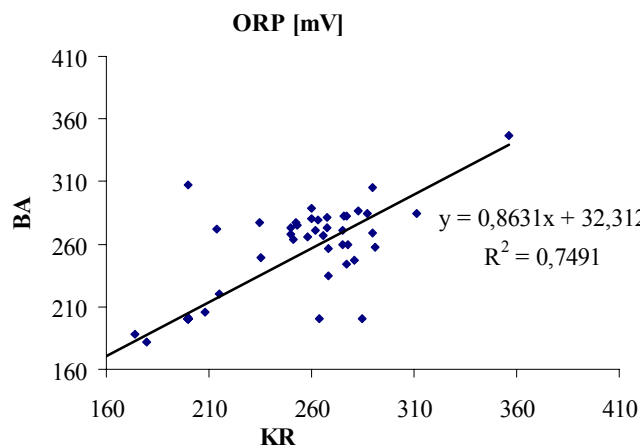
Z teorie [51] platí, že změna pH o jeden řád (pro změnu z hodnoty pH ze 7 na 8) odpovídá změně potenciálu skleněné elektrody o -59,15 mV. Pokud tedy nastane výraznější změna hodnot pH, projeví se toto také při měření ORP, což může mít za následek změny formy kontaminantů (nárůst pH zpravidla vede ke snížení rozpustnosti kovů). ORP hodnota je také funkcí teploty (zvyšování teploty má za následek pokles hodnot ORP).



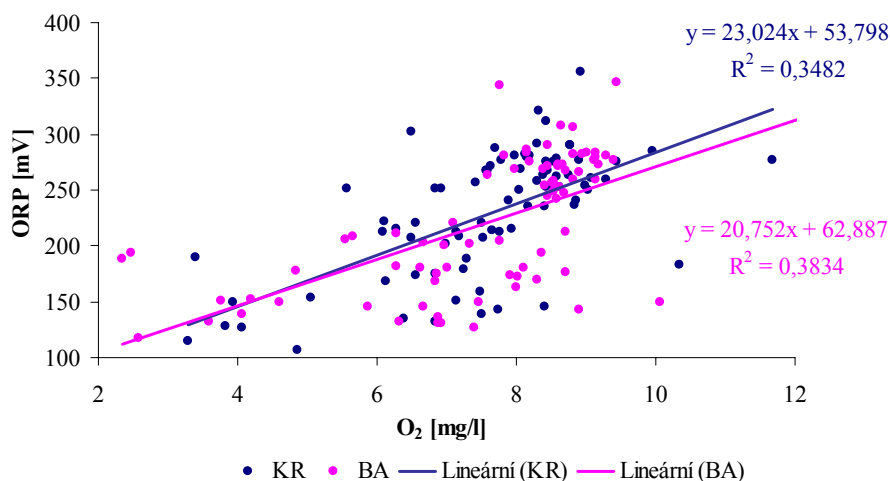
Obrázek 56 - Průběh ORP v bioreaktorech KR, BA, a další průběhy s tím související

⁵ Elektrony se uvolňují ze substrátu v důsledku bakteriální činnosti, za vzniku oxidu uhličitého.

Průměrná hodnota ORP pro celoroční pozorování pro nosiče AnoxKaldnes (KR) činí 74,795 mV, kdežto pro nanovláknenné nosiče (BA) je tato hodnota 76,342 mV. Rozdíl těchto hodnot je zcela mizivý, což dokazuje také vzájemný graf korelace technologie BA a KR, $BA = f(KR)$, *Obrázek 57* (lze usuzovat, že nově vyvíjená technologie (BA) nemá negativní vliv na hodnotu ORP pro oxické podmínky).



Obrázek 57 - Korelace dat BA, KR pro hodnoty ORP



Obrázek 58 - Korelace dat ORP, kyslík pro KR, BA

Nižší obsah kyslíku v systému, tak může způsobovat zastavení oxických pochodů. Nízká koncentrace kyslíku ve vodě nepřijímá dostatečné množství elektronů z degradačních pochodů mikroorganismů, a proces oxidace se tak zastaví.

Možný je také malý vliv s absorbancí, neboť snížený oxidačně redukční potenciál může mít vliv na schopnost MO degradovat substrát, v závislosti na kyslíku.

ORP lze považovat za komplexnější pohled na problematiku oxidačních reakcí (zahrnuje vliv pH, O_2 , teploty). Pro biologické čištění OV tak lze měřením ORP monitorovat a optimalizovat chod oxidačních procesů.

9.10 Další faktory biodegradace

Kromě zajištění vhodných podmínek pro správný a efektivní průběh biodegradace, je nutné brát ohled na několik faktorů, které mohou také ovlivnit celý proces. Tyto parametry v práci zohledňovány nejsou, avšak je vhodné je krátce charakterizovat.

9.10.1 UV světlo

Záření přichází na zemský povrch ze slunce a ostatních mimozemských zdrojů a rovněž vzniká na zemi z různých umělých zdrojů. Záření mají různou vlnovou délku a energii, čím kratší je vlnová délka záření, tím vyšší má energii. Rentgenové záření (X paprsky) a gama záření patří mezi ionizující záření. Toto záření ionizuje vodu a vytváří vysoce aktivní volné radikály, které mají destruktivní účinek na DNA. Účinek záření je závislý na stáří buněk, složení media a na teplotě. Ultrafialové světlo (UV) světlo vlnové délky 240–300 nm má mutagenní a letální účinky na mikroorganismy. Nejúčinnější je UV světlo o vlnové délce 265 nm, které poškozuje DNA tvorbou pyrimidinových dimerů. UV světlo také vyvolává tvorbu toxických peroxidů a ozonu. Vyšší dávky buňky usmrcují, při nižších dávkách buňky přežívají, zvyšuje se však počet mutací. Už i obyčejné sklo UV záření pohlcuje a chrání tak mikroorganismy před jeho účinky. [20]

9.10.2 Antimikrobiální látky

V současnosti je známá celá řada chemických látek, jak anorganického, tak organického původu, které působí toxicky na mikroorganismy. Jsou označovány jako antimikrobiální látky a mohou se využívat jako desinfekční prostředky, léky (antibiotika, sulfonamidy) nebo potravinářské konzervační prostředky. Podle jejich účinku na mikroorganismy je dělíme na mikrobistatické, které pouze zastavují růst a rozmnožování a na látky mikrobicidní, které působí na buňky letálně. Účinek antimikrobiálních látek závisí na jejich koncentraci. Velmi nízké koncentrace naopak stimulují životní pochody v buňce. Účinná koncentrace jednotlivých látek s antimikrobiálním účinkem závisí na druhu použité látky i na mikroorganismu, na který látky působí. [20]

9.10.3 Hydrostatický tlak

Velký počet mikroorganismů je ve své životní činnosti ovlivňován změnami hydrostatického tlaku. Vlivem vyššího tlaku dochází ve většině případů ke zpomalení či ztrátě pohybu, ke změnám v metabolismu a zastavení růstu. Mechanismus účinku hydrostatického tlaku spočívá především ve zmenšování objemu a zvyšování viskozity buněčného obsahu, čímž dochází k inaktivaci enzymů a tím ke snižování rychlosti nebo přímo k zastavení biochemických reakcí. Účinek zvýšeného tlaku závisí i na době a teplotě působení. [53]

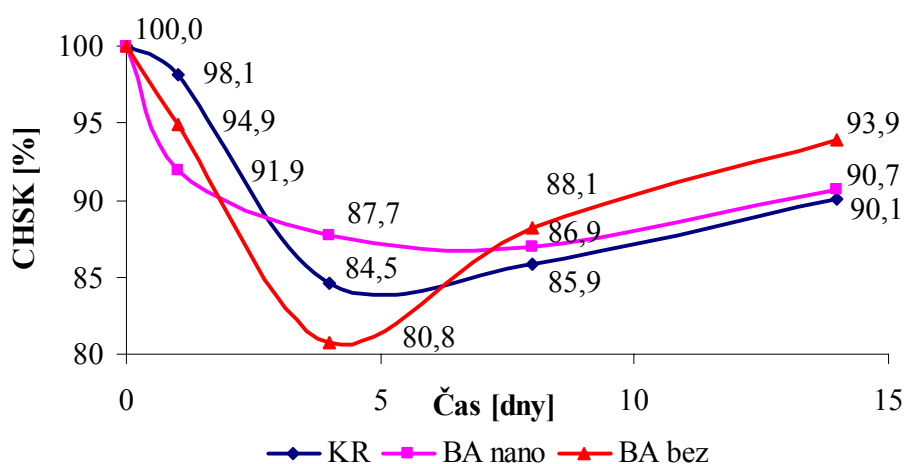
9.10.4 Osmotický tlak

Vzhledem k potřebě buňky zachovat vnitrobuněčné napětí v žádaném rozmezí, a to navzdory měnící se osmomolaritě vnějšího prostředí není překvapující, že buňka disponuje mechanismy, které ji umožňují upravovat svoji vnitřní osmomolaritu podle aktuální situace. Buňka odpovídá na vnější hyperosmotický stres vzrůstem interní koncentrace několika látek. Je samozřejmé, že vzrůstající vnitřní osmomolarita má své omezení, následkem čehož se inhibuje aktivita některých enzymů a postupně se zastavuje buněčný růst. V závislosti na citlivosti k roztokům solí lze rozlišit mikroorganismy nehalofilní, mírně, středně a extrémně halofilní. [53]

9.11 Sorpce

Sorpce může ovlivňovat biodegradaci nejrůznějšími mechanismy. Anorganické živiny a růstové faktory jsou sorbovány na materiál, čímž jsou pro MO v médiu nedostupné. Mikroklima v těsné blízkosti povrchu sorbentu může být méně vhodné v porovnání s okolním roztokem, neboť povrch sorbetu přitahuje a koncentruje dané látky (například soli, nebo H^+ ionty z roztoku, čímž dochází k významnému snížení hodnoty pH v jeho těsné blízkosti). Jestliže okolní roztok obsahuje jen velmi nízké koncentrace živin, pak sorbent může tyto živiny koncentrovat na svém povrchu. Sorbované sloučeniny jsou přímo využívány mikroorganismy, které adherují k těmto povrchu, (zvýšený nárůst mikroorganismů na povrchu materiálu). „Zahuštěné“ mikroorganismy na povrchu sorbentu pak mohou účinněji degradovat polutant v porovnání s nízkým počtem buněk degradátora ve vodné fázi. Sorpce mikroorganismů na povrchy může být podle studovaného mikrobiálního druhu nebo degradačního společenstva reverzibilní i ireverzibilní, přičemž jejich metabolická aktivita může být nezměněna nebo je ovlivněna pozitivně či negativně. [18]

Sorpce je často považována za jednoduchý vratný proces k dosažení rovnováhy celého systému. Ve skutečnosti se jedná o proces dvoufázový, ve kterém po počáteční krátké a rychlé fázi (obvykle <1 h) následuje pomalá a dlouhá fáze (zpravidla dny). [18] I když má sorpce značný význam pro biodegradaci organických látek v přírodě, přesto je jí věnována malá pozornost.



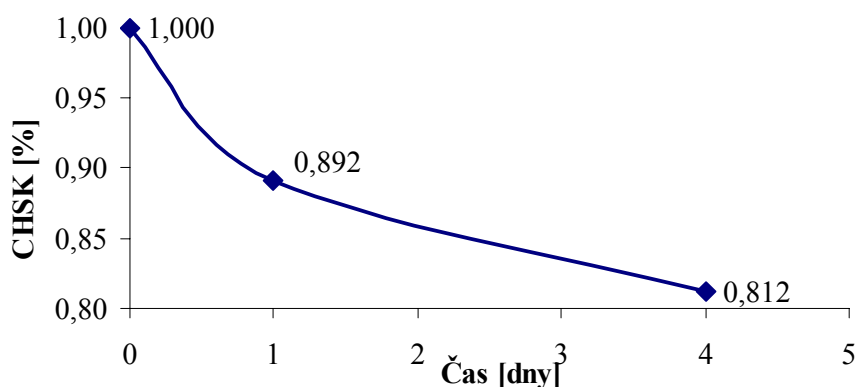
Obrázek 59 - Průběh sorpce na daném typu nosiče

Ponoříme-li materiál (daný nosič – KR, BA_nano, BA_bez nano) do prostředí (čistá odpadní voda bez bakteriální suspenze), ve kterém se vyskytují molekuly jiných látek (kontaminace – zejména anilin, kyanidy, DPG), dojde k celé řadě procesů (Obrázek 59). V závislosti na elektrickém náboji látky a částic jde o elektrické přitahování, resp. odpuzování. Makroskopicky se tyto procesy projevují pronikáním či usazováním látek na povrchu materiálu (difúze, sorpce), a to v závislosti na jeho struktuře, složení, stavu povrchové vrstvy, distribuci pórů aj. Zároveň dochází k úbytku koncentrace látky z prostředí (sledováno poklesem hodnoty CHSK). V grafu je vynesena závislost sorpce na daném typu nosiče (různý materiál, různá struktura). Pokles je pro lepší orientaci vyjádřen v procentech (maximální hodnota CHSK je 1660 mg/l, která poklesla až na hodnotu 1340 mg/l). Sorpce látek na nanovláknenný nosič BA_nano má nejhladší průběh, na nosiči se nevyskytuje takové množství kontaminace, které by mohlo na MO působit inhibičně, což může také velice usnadňovat počáteční kolonizaci. Důležitým hlediskem sorpce je především teplota a čas. Teplota byla udržo-

vána při 25 °C, závislost na čase je uvedena v grafu na x-ové ose. Nakonec dochází k desorpci molekul kontaminantu zpět do okolí. Při kontinuální kultivaci, lze tento parametr jednoduše zanedbat.

9.12 Proces těkání

Lehce těkající organické látky (polutanty s nízkou rozpustností a s nízkou polaritou) se spíše odpaří než by byly degradovány. Vháněný vzduch usnadňuje těkání některých organických kontaminantů. Celý proces výrazně ovlivňuje teplota (zde 25 °C). Jelikož se v práci užívá spíše kontinuální kultivace, kdy doba zdržení je dostatečně krátká, lze tento vliv zanedbat. Pro dokreslení modelové situace je tato závislost vyjádřena na *Obrázek 60*.



Obrázek 60 - Proces těkání kontaminantů z reálné odpadní vody

9.13 Degradace nosičů

Pro polyethylenové nosiče (KR) se doposavad neprojevili žádné závažné problémy týkající se jejich užití v laboratorní praxi, ani v reálné průmyslové praxi na CHBČOV Draslovka Kolín.

Nově vyvíjené nanovláknenné nosiče jsou prozatím ve stádiu vývoje, proto jejich negativní vliv na prostředí nebyl prokázán. V laboratorních experimentech se v první fázi po nasazení nosiče do reaktoru, před jejich kolonizací, projevilo odpoutávání nanovláknenné vrstvy, která se tak dispergovala do roztoku a následně docházelo k jejímu odplavování do odtokové nádrže. Což by v reálné praxi mohlo působit potíže zejména tam, kdy se vyčištěné odpadní vody vypouští do přírodních vodních toků (řeky, jezera aj.). Riziko tak vyvstává zejména pro vodní organismy (jak mikroorganismy, tak i vyšší živočichy), následkem čehož i pro člověka. Toto riziko bude dále podrobněji ověřováno v navazujících pracích. Pokud ovšem bude potvrzeno, je pro tuto technologii možným řešením využití přídavné technologie, spočívající ve využití filtračního zařízení, které by zcela jednoduše zachytávalo možné úniky těchto vláknenných vrstev.

10 Diskuse výsledků

Doba zdržení

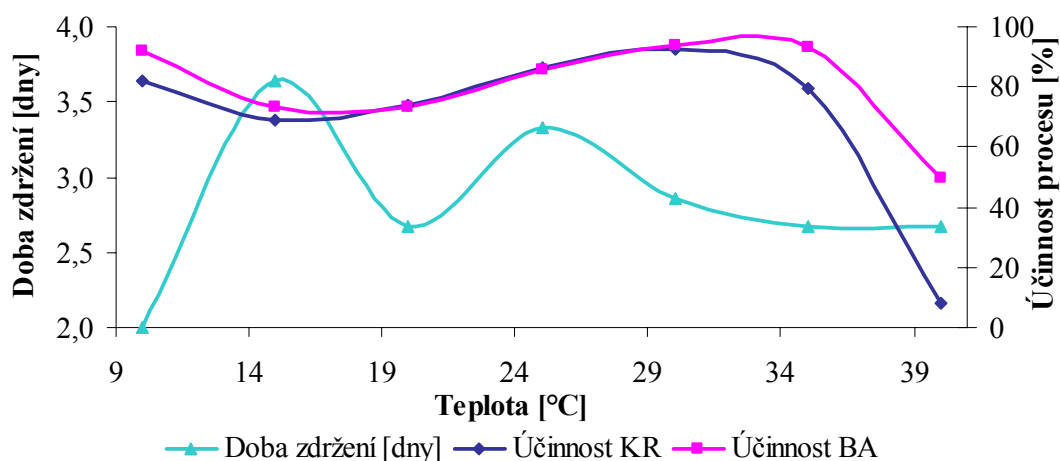
Přítok substrátu (kontaminantu) je hlavním parametrem určujícím látkové zatížení. Doba zdržení se v laboratorním modelu pohybuje v rozmezí od 10,00 dní do 1,67 dne. Na CHBČOV Draslovka Kolín je doba zdržení od 20,80 dne do 3,42 dne. V reálné praxi je vývoj velice nerovnoměrný (stejně tak látkové zatížení). V laboratorním ověřování byl průtok a látkové zatížení v delším časovém horizontu ideální (konstantní průtok a konstantní látkové zatížení). Z uvedených hodnot doby zdržení lze shrnout, že pokud by podnik stabilizoval přítokové látkové zatížení OV (stanoveno dle CHSK), bylo pak možné snížit dobu zdržení v reaktorech až 1,5krát (maximálně 2krát). Snahou je maximalizovat přítok dle přípustného látkového zatížení. Vhodné by tak v reálné praxi bylo, umístit před reaktory vyrovnávací nádrž, která by umožnila vyrovnávat přítok OV do bioreaktorů v závislosti na hodnotě CHSK (umožnit dlouhodobě neměnné látkové zatížení, vyšší hodnoty CHSK by způsobovaly snížení přítoku OV).

CHSK

Průměrná účinnost procesu pro celoroční pozorování je pro KR – 83 %, BA – 85,5 %. Technologie na bázi nanovláken (nosiče s označením BA) jsou z dlouhodobého hlediska optimálnější, a to v průměru o 10 % až 42 % (v závislosti na teplotě a dalších podmínkách). V obou modelech se vyskytuje bakteriální suspenze, která zejména v úvodních fázích realizuje velké procento odstraňování anilinu a ostatních substrátů (hodnota po 2 měsících provozu může činit až 90 % při době zdržení 4,5 dne).

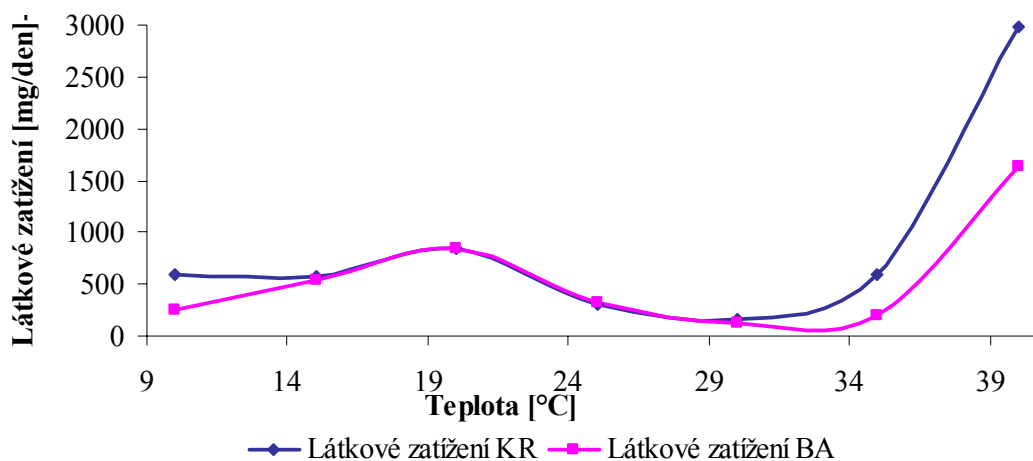
Z hodnot CHSK byly určeny doby zapracování bioreaktorů (jako celku). Čas adaptace pro komerční technologii (KR) činí 59 dnů. Pro nanovláčennou technologii (BA) je doba adaptace 53 dnů. Výsledek dokazuje vyšší schopnost nanovláčenné vrstvy ke kolonizaci mikroorganismy. Nanovláčenná technologie tak umožňují rychlejší zapracování nosiče, a tím také zkrácení potřebné doby kultivace. Nově vyvíjená technologie (BA) dosahuje pro celoroční pozorování průměrně nižších hodnot CHSK.

Na odtoku z reaktoru se i při dlouhé době zdržení nacházejí zbytkové koncentrace, které jsou pro MO téměř nerozložitelné. Jde o meziprodukty z výroby (prozatím neidentifikované zbytkové organické látky).



Obrázek 61 - Závislost účinnosti čištění OV na průtoku a teplotě pro KR, BA

Na grafu (Obrázek 61) je zachycena účinnost procesu (z hodnot CHSK) v závislosti na teplotě a době zdržení. Účinnost za využití technologie nanovláknenných nosičů je po celou dobu vyšší, což dokazuje vyšší odolnost především imobilizovaných MO za použití nanovrstev. Obrázek 62 dokládá totéž pro závislost látkového zatížení na teplotě.



Obrázek 62 - Průběh látkového zatížení na teplotě

Otázkou je, proč využití nanovláknenné technologie (BA) má vyšší účinnost za extrémních teplot, který parametr je určující (T, O₂, salinita). Přímé vysvětlení není dosud známo, bude předmětem dalšího studia.

Teplota

Teplota ovlivňuje nebiologické mechanismy degradace kontaminantů. Při vyšších teplotách dochází k odparu vody a tím k zahušťování kultivačního prostředí, což následně vede k nárůstu salinity. Nízké teploty mohou být příčinou srážení látek.

Minimální ověřovaná teplota byla 10 °C. Teplota však nezpůsobila větší problémy, proto je možná spodní hranice ještě nižší. Maximální doporučená teplota (určena z hodnot CHSK a absorbance), při které lze daný reaktor provozovat je 40 °C. Pro spodní hranici měřené teploty je účinnost procesu KR – 82 %, BA – 92 %, při době zdržení 48 hodin. Pro horní hranici měřené teploty je účinnost procesu KR – 9 %, BA – 50 %, při době zdržení 64 hodin. Při horní hranici proběhlo mikroskopické pozorování bakteriální populace. Také byl zachycen synergický vliv vyšší teploty na zvýšení salinity v prostředí.

Rozpuštěný kyslík, respirace

Vhodné je zajistit co největší součinitel přestupu kyslíku, a to správnou konstrukcí a umístěním aerátorů, tvarem distributoru vzduchu, velikostí vzduchových bublin atd. Množství kyslíku je limitujícím faktorem pro život organismů.

Doložen byl chybný postup výpočtu hodnoty $r_{V, NOSIČ}$ rozdílem $r_{V, CELKEM} - r_{V, SUSPENZE}$. Důkaz chybné metody je doložen měřením v laboratorních podmínkách.

Mylný přístup součtu jednotlivých rychlostí je způsoben rozdílnou rychlostí degradace bakterií dispergovaných v roztoku a bakteriích, které jsou vázané na nosiči v biofilmu (degradují zcela jinou rychlostí, pokud jsou v médiu sami a když se v systému nachází obě společenství zároveň - probíhají konkurenční degradační postupy MO dispergovaných a MO imobilizovaných). Celková rychlost procesu se tak snižuje, pokud jsou tyto populace v systému společně. Je tedy třeba měřit jak společnou

respiraci, tak respirace každé frakce zvlášť. Celková rychlost procesu tak není součtem jednotlivých dílčích rychlostí. Také není správné uvažovat hodnotu $r_{V, \text{nosič/celk}}$ [%], neboť je tak zatížena velkou chybou. V laboratorních podmínkách byla ověřována respirační rychlost pro různé teploty.

Živiny

Studovaná reálná OV obsahuje dostatek mikronutrientů, jejich další dávkování není zapotřebí. Limitujícím faktorem je obsah makronutrientů, které musí být dávkovány dodatečně, a to ve využitelné formě (fosfor ve formě fosfátu, příp. kyseliny fosforečné). Velkým problémem může být pro MO vysoká koncentrace chloridů 26,7 g/l (negativně působí také při stanovení CHSK).

Hodnocení bakteriálního růstu

Dispergované MO lze jednoduše hodnotit vývojem optické density. Hodnocení vývoje biofilmové populace MO tak jednoduché není. Nejjednodušším způsobem je stanovení sušiny na nosiči, které je ovšem zatíženo velkou chybou nerozpuštěných látek, které jsou v OV přítomny. Dalším způsobem je mikroskopické pozorování a následná obrazová analýza stavu biofilmu. Specifická růstová rychlost je limitována prostředím (doba zdržení, koncentrace substrátu, živiny, O₂, teplota, RAS a pH). Adaptační čas je ovlivněn řadou faktorů jako jsou podmínky, ve kterých buňky žily dříve, množství biomasy, která byla přenesena, teplota, typ substrátu aj.).

Aktivita bakteriální suspenze se podílí na odstraňování anilinu rozhodujícím způsobem. V provozním reaktoru je až cca 90 % anilinu odstraňováno právě biomasou v suspenzi. V počáteční fázi se biofilmová kultura podílí na odstraňování anilinu cca 10 – 13 %. Nárůst biofilmu je dlouhodobou záležitostí a v budoucnu lze očekávat zvýšení podílu odstraňování anilinu biofilmem.

Velký vliv má hodnota průtoku, která způsobuje vyředění disperzní populace MO. Pokud dojde k velkému vyředění, bylo laboratorně dokázáno, že biofilm na nosiči nanovlákně technologie (BA) převezme funkci degradačních procesů imobilizované frakce MO.

Příčinou ztráty biodegradability tak může být především: extrémní koncentrace toxické látky (nemůže tak dojít k množení MO), nízká koncentrace polutantu (zdroj uhlíku) vylučuje růst a množení mikroorganismů, substrát není v takové formě, která by byla dostupná pro mikroorganismy (například sraženiny), příliš nízká koncentrace živin, vysoká teplota, nízká doba zdržení, extrémní hodnoty pH, O₂, aj.

Použité technologie (KR – komerční nosič AnoxKaldnes, BA – nanovlákně nosič) tak mají vliv nejen na tvorbu biofilmu, ale mají také vliv na bakteriální populaci v médiu, které tak musí soupeřit s imobilizovanými MO o substrát. Mírně nižší hodnoty absorbance u technologie BA, potvrzuje lepší zapracování a kolonizaci nosiče a vyšší aktivitu MO vázaných na nosič ve formě biofilmu.

Sušina

Dostatečná kolonizace pro komerční nosič (KR – AnoxKaldnes) proběhne za 362 dnů, pro technologii (BA – nanovlákně technologie) za 167 dnů. Výsledek tak potvrzuje, že kolonizace nanovlákně vrstvy může probíhat daleko rychleji. Dokonce více jak dvakrát rychleji, zejména v úvodních fázích kolonizace, což potvrzuje také obrazové hodnocení biofilmu.

Obrazové hodnocení biofilmu

Proběhlo mikroskopické pozorování nosičů v průběhu prvních tří týdnů kolonizace. Pomocí obrazové analýzy a jejího vyhodnocení plynou následující závěry.

Na polyethylenových nosičích AnoxKaldnes (KR) se bakteriální biofilm uchycuje velice pomalu (zapříčiněno nedostatečnou adhezí MO k povrchu nosiče). Mírně lepších výsledků vykazují předem kolonizované nosiče (téměř okamžitě jej tak mohou kolonizovat). Pro totožný typ nosiče tak lze dosáhnout předúpravou jeho povrchu (narušením svrchní vrstvy například v kyselině) vyšší schopnosti kolonizace mikroorganismy.

U nanovláknenných nosičů usedají MO přímo na nanovláknenné vrstvy. Přítomnost těchto vrstev je nezbytnou součástí pro rychlou kolonizaci. Zapracování sférického nosiče s využitím nanovrstvy je více jak šestkrát rychlejší než u komerční technologie AnoxKaldnes (pro nosiče bez nanovláknenné vrstvy dvakrát rychlejší).

Dotvrzena byla také dobrá kolonizační schopnost MO k danému typu nosiče. MO kopírují především místa s nanovláknennou vrstvou, časem se rozrůstají i mimo tuto plochu a zaplňují místa po celém nosiči.

pH

Změny pH byly důkladně monitorovány. Rápidní změny o 1 či 2 jednotky mohou inhibovat mikrobiální aktivitu. Výkyv může být způsoben vysokým obsahem rozpuštěných solí v přitékající surové OV. Výsledkem přítoku takto extrémně zasolené surové vody je snížení hodnoty pH, a následná adaptace MO k této vysoké salinitě.

Konduktivita

Růst nebo pokles teploty o 1 °C způsobuje změnu konduktivity o 2 %. V ověřovaném rozmezí teplot, tak lze očekávat nárůst vodivosti až o 60 %. Měření vodivosti může být rušeno nerozpuštěnými látkami.

Vysoká salinita má také vliv na počáteční rychlost kolonizace. Vysoká adhesivita solí k povrchu nosiče způsobuje uplívání solí na povrchu nosiče. Teprve až na těchto solných vrstvách se vyskytují MO (nejprve je kolonizován povrch solí a odsud dále povrch samotného nosiče, platí jen pro případ vysoce zasolených vod). Výhodným přístupem je tak využití nanovláknenné vrstvy, kde MO usedají přímo na nanovláknenné vrstvě.

ORP

Nižší obsah kyslíku v systému může způsobovat zastavení oxických pochodů. Nízká koncentrace kyslíku ve vodě nepřijímá dostatečné množství elektronů z degra-dačních pochodů mikroorganismů, a proces oxidace může zpomalit.

Snížený oxidačně redukční potenciál má mít vliv na schopnost MO degradovat substrát (v závislosti na kyslíku). ORP vyjadřuje komplexnější pohled na problematiku oxidačních reakcí (zahrnuje vliv pH, O₂, teploty).

Sorpce

Sorpce může ovlivňovat biodegradaci nejrozumnějšími mechanizmy. Sorpce organických látek z OV na nanovláknenný nosič je cca. 13 %. Pro komerční technologii je to až 20 %, což může mít za důsledek jeho pomalejší rychlost kolonizace. Vyskytuje se zde takové množství kontaminace, které by mohlo na MO působit inhibičně.

Důležitým hlediskem sorpce je především teplota a čas. Při kontinuální kultivaci, lze tento parametr zanedbat.

Proces těkání

V práci (a také v reálné aplikaci) se užívá kontinuální kultivace, která je výrazně ovlivněna teplotou. Proto nelze vliv vytěkání kontaminantů z OV, který činí až 20 %, zanedbat.

Degradace nosičů

Pro polyethylenové nosiče (KR) se doposavad neprojevily žádné závažné problémy týkající se jejich užití v laboratorní praxi, ani v reálné průmyslové praxi na CHBČOV Draslovka Kolín. Nově vyvíjené nanovláknenné nosiče jsou prozatím ve stádiu vývoje, proto jejich negativní vliv na prostředí nebyl prokázán.

11 Závěr

Účelem práce bylo ověřit základní technologické parametry (doba zdržení OV, resp. maximální látkové zatížení, teplota), které jsou dány především fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi prostředí. Fyzikální parametry modelu byly předem dány (reprodukce podmínek reálné plnoprovozní aplikace, například struktura reaktoru, velikost nosiče, jeho aktivní povrch, míra plnění reaktoru nosičem a další). Chemická podmínka je vyjádřena především užitím reálné OV. Chemické analýzy zahrnovaly pravidelné měření CHSK, rozpuštěného kyslíku, pH, výjimečně chloridů, fosforečnanů, dodatečně také konduktivity a ORP. Mikrobiologické analýzy obnáší hodnocení odstraňování substrátu, bakteriálního růstu a respirační testy.

K identifikaci limitních stavů technologických parametrů a látkového zatížení (koncentrace kontaminantů), byl dlouhodobě provozován laboratorní model biofilmového reaktoru s komerčně dostupným nosičem. Nalezení hraničních podmínek umožnilo optimalizaci existující technologie, zejména se zaměřením se na kyanidy a anilín (při maximální účinnosti biodegradačního procesu). Optimalizace obnášela také vytvoření alternativního přístupu (nosič za využití moderní technologie výroby polymerních nanovlákných vrstev).

V diplomové práci byly v rámci dlouhodobého provozu laboratorního biofilmového reaktoru dosaženy následující hlavní výsledky:

- Základní charakteristika reálné odpadní vody plnoprovozní aplikace Lučební závody Draslovka a.s. Kolín (obsahy anilinu, CN^- , DPG a dalších meziproductů výroby).
- Srovnávání laboratorního měření s průmyslovými, čehož výsledkem je návrh metodiky při měření respiračních testů.
- Nalezení optima biodegradace při teplotách v rozmezí 10 °C – 35 °C (v závislosti na látkovém zatížení). Důležitou podmínkou je optimalizace dodávky kyslíku a nutrientů.
- Vyhodnocení limitujících faktorů bioremediace, kterými jsou především vyčerpání substrátu (pokles CHSK) a živin (zejména fosforečnany).
- Optimalizace stávající komerční technologie AnoxKaldnes moderní nanovláknou technologií (zvýšení aktivního povrchu nosiče, zrychlení zpracování nosiče nejen v úvodní fázi kolonizace, ale také při jeho revitalizaci v průběhu činnosti systému, například při extrémních nárazových stavech).

Závěrečná doporučení

Závěrem práce je doporučení, co by mělo být v navazujících pracích ještě doplněno, a to:

- V navazujících testech by bylo vhodné určovat nejen hodnotu CHSK (jako ukazatel všech organických látek), ale stanovovat zvlášť kyanidy, anilín, DPG a ostatní látky OV (z čehož prozatím jsou identifikovány - fenylnmočovina a difenylnmočovina, zbylé je nutné ještě dodatečně určit). Zejména za využití iontové a kapalinové chromatografie. Z těchto výsledků by bylo možné získat závěr, jaká populace MO (zda vázaná na nosič či dispergované volně v médiu) degraduje kterou složku v OV (kyanidy, anilín, DPG). Z toho by bylo dále možné optimalizovat technologii celého procesu v průmyslovém podniku.
- Obsah mikronutrientů v reaktorech bohužel nebyl sledován dostatečně často. V navazujících testech by ke stanovení bylo vhodné užít například iontovou chromatografii. Detailnější průběh spotřeby živin by mohlo přispět k optimalizaci plnoprovozní aplikace (minimálně snížení nákladů).
- Jelikož se nanovláknenný nosič velice technologicky ověřil je doporučeno jeho další využití. Jelikož forma „nanobambule“ je časově a technologicky náročnější bylo by vhodnější přistoupit na tvarově jednodušší formu, například tzv. chipsy (zformovaná textilie s nánosem nanovrstvy), které by se v reaktoru pohybovaly zcela volně. Případně by bylo možné využít textilní pleteniny, která by byla v reaktoru upevněna a OV by se pohybovala skrze ni.
- Jelikož ekonomické hledisko v průběhu práce nebylo doposavad známo, bylo by vhodné jej do příští práce také zakomponovat (zejména platí pro nanovláknenné nosiče).

Shrnutí

Výsledky laboratorních experimentů i plnoprovozní aplikace ukazují, že biologické čištění průmyslových OV v biofilmovém bioreaktoru je velice vhodnou variantou, jak odstraňovat specifické znečištění, jako např. anilín, kyanidy a DPG v OV z výroby DPG. Bakterie rodu *Rhodococcus* splňují podmínky, které jsou na ně kladeny a velice dobře se přizpůsobují změnám vnějších podmínek. Kvalita odtoku splňuje požadované nároky v širokém rozsahu rozhodných technologických parametrů. Polyethylenový nosič byl shledán jako vyhovující, stejně tak i sférické nosiče s nanovláknenným povrchem, které díky svému vysokému aktivnímu povrchu potvrdily jejich nespornou výhodu. Biofilm se vyvíjel na obou typech technologie velice dobře. Nanovláknenný nosič se však jeví pro bakterie vhodnější, neboť biofilm narůstal několikanásobně vyšší rychlostí než na PE nosiči, což má zásadní význam jednak při zapracování systému, ale zejména v případech regenerace po mimořádných událostech, které jsou v reálné praxi vysoce pravděpodobným rizikem.

12 Literatura

- [1] *Nanotechnologie - Inovace pro zítřejší svět*. Evropská Komise - Generální ředitelství pro výzkum, 2007. 58 p. Available from [www](http://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanotechnology_bat_cs.pdf): [ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanotechnology_bat_cs.pdf](http://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanotechnology_bat_cs.pdf). ISBN 92-79-00879-X
- [2] PRNKA, T.; ŠPERLINK, K. *Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicina*. Repronis Ostrava, 2006. 177 p. Available from [www](http://www.nanotechnologie.cz): www.nanotechnologie.cz. ISBN 80-7329-134-7
- [3] ČERNÍK, M. *Použití nanočástic elementárního železa pro redukce kontaminantů in-situ*: habilitační práce. Technická univerzita v Liberci, 2006. 134 p.
- [4] Výzkumné centrum pro nanopovrchové inženýrství "NANOPIN". *Vlastnosti fotokatalytického TiO₂*. Available from [www](http://www.nanopin.cz/cz/cz_page01.html): http://www.nanopin.cz/cz/cz_page01.html
- [5] *Nanomateriály jako azbest*. Lidové noviny a.s., Available from [www](http://www.lidovky.cz/nanomaterialy-jako-azbest-dc2-/ln_veda.asp?c=A080522_095851_ln_veda_nev): http://www.lidovky.cz/nanomaterialy-jako-azbest-dc2-/ln_veda.asp?c=A080522_095851_ln_veda_nev
- [6] BIOTRIN.CZ *Často kladené otázky z biotechnologie II*. Available from [www](http://www.biotrin.cz/czpages/inf051303d.htm): <http://www.biotrin.cz/czpages/inf051303d.htm>
- [7] *Úvod do biologických technologií*: sylabus k předmětu. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. Available from [www](http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/uvod.pdf): <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/uvod.pdf>
- [8] BIOTRIN.CZ *Často kladené otázky z biotechnologie I*. Available from [www](http://www.biotrin.cz/czpages/inf051303.htm): <http://www.biotrin.cz/czpages/inf051303.htm>
- [9] CHUDOBA, J.; DOHÁNYOS, M.; WANNER, J. *Biologické čištění odpadních vod*. Praha, 1991
- [10] INOVACE.CZ *Co jsou to biotechnologie*. Available from [www](http://www.inovace.cz/cz/technologie-a-inovace/trendy/biotechnologie/): <http://www.inovace.cz/cz/technologie-a-inovace/trendy/biotechnologie/>
- [11] INOVACE.CZ *Dělení biotechnologií*. Available from [www](http://www.inovace.cz/cz/technologie-a-inovace/trendy/biotechnologie/deleni-biotechnologii/): <http://www.inovace.cz/cz/technologie-a-inovace/trendy/biotechnologie/deleni-biotechnologii/>
- [12] BIOTRIN.CZ *Průmyslová biotechnologie*. Available from [www](http://www.biotrin.cz/czpages/inf051303f.htm): <http://www.biotrin.cz/czpages/inf051303f.htm>
- [13] Konvergující technologie. *Utváření budoucnosti evropské společnosti*, příručka č. 1 V. řady, vyd. ČSNMT/Repronis, 10/2005, ISBN 80-7329-103-7
- [14] LEDERER, T. *Biodegradační metody sanace*. Podnik a životní prostředí. 1999, RAABE, G3.2
- [15] *Bioekologie*: sylabus k předmětu. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. Available from [www](http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/bioekologie.pdf): <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/bioekologie.pdf>
- [16] *Čištění odpadních vod*. Available from [www](http://www.cisticka.info/): <http://www.cisticka.info/>

- [17] HLAVÍNEK, P. *Biofilmové reaktory*. VUT Brno, Fakulta stavební, Ústav vodního hospodářství, Available from [www: http://www.water.fce.vutbr.cz/zamestnanci/hlavinek/download/cisteni_OV/prednasky/COV_08.pdf](http://www.water.fce.vutbr.cz/zamestnanci/hlavinek/download/cisteni_OV/prednasky/COV_08.pdf)
- [18] HORÁKOVÁ, D. *Bioremediace*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, 2006. 83 p.
- [19] HRDINOVÁ, J. *Mikrobní biofilm jako nástroj v bioremediačních technologiích*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, 2006. 89 p.
- [20] *Principy mikrobiologické práce: sylabus k předmětu*. VŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie. Available from <http://biomikro.vscht.cz/documents/labmikro/skriptalab.pdf>
- [21] CARVALHO, C.; FONSECA, M. Appl. Microbiol. Biotechnol. *The remarkable Rhodococcus erythropolis*, 2005, 715-726.
- [22] BELL, K.; PHILP, J.; AW, D. Journal of Applied Microbiology. *The Genus Rhodococcus*, 1998, 195-210.
- [23] CHUMCHALOVÁ, J. *Rhodococcus erythropolis - Miniatlas mikroorganismů*. Praha: FPBT VŠCHT. Available from [www: http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/rhodo.htm](http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/rhodo.htm)
- [24] KŘÍKLAHOVÁ, L.; LEDERER, T. *Optimalizace biologického čištění průmyslových odpadních vod v biofilmovém bioreaktoru*. Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi, 2008. ISBN 978-80-86832-37-1.
- [25] Domovská stránka komerční technologie AnoxKaldnes, <http://www.anoxkaldnes.com/Eng/c1prodc1/mbbr.htm>, <http://www.veoliawaterst.com/mbbr/cz/applications.htm>
- [26] MILITKÝ, J. *Technické textilie - vybrané kapitoly*. II. ed. TUL, 2007. 238 p. ISBN 978-80-7372-170-1.
- [27] Studijní materiály. *Přehled polymerů*. Available from [www: http://vyuka.zmoravec.net/download/1-04polymery4.pdf](http://www.vyuka.zmoravec.net/download/1-04polymery4.pdf)
- [28] Materiálový list. *Technické plasty a jejich vlastnosti*. Available from [www: http://www.lpm.cz/](http://www.lpm.cz/)
- [29] MILITKÝ, J. *Přednášky: Textilní vlákna; Speciální vlákna*. II. th ed. TUL, 2007. 423 p. ISBN 978-80-7372-169-5.
- [30] *Galerie materiálů*. TUL, Fakulta textilní, Katedra netkaných textilií. Available from [www: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nove/dokumenty/katedra/download/materialy_knt.pdf](http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nove/dokumenty/katedra/download/materialy_knt.pdf)
- [31] RŮŽIČKOVÁ, J. *Elektrostatické zvlákňování nanovláken*. Ist ed. TUL, 2004. 54 p. ISBN 80-7083-867-1.
- [32] MACHAŇOVÁ, D. *Předúprava textilií I*. Ist ed. TUL, 2005. 190 p. ISBN 80-7083-971-6.
- [33] MALÝ, J.; HLAVÍNEK, P. *Čištění průmyslových odpadních vod*. Brno: NOEL 2000, 1996. 255 p. ISBN 80-86020-05-3

- [34] *Chemický a fyzikální rozbor vody*. Available from www: <http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/rozbor%20vody.doc>
- [35] LEDERER, T. *Vyhodnocení zkušebního provozu chemicko-biologické čistírny odpadních vod Lučební závody Draslovka a.s. Kolín* - interní materiál. AQUATEST a. s., 2008
- [36] Bezpečnostní list produktu - *Technický anilin*. Available from www: [http://www.bc-mchz.cz/site/mchz/web.nsf/pages/B86F42AC5D2A098AC1257097003BA06D/\\$file/AnilinBezpCZ.pdf](http://www.bc-mchz.cz/site/mchz/web.nsf/pages/B86F42AC5D2A098AC1257097003BA06D/$file/AnilinBezpCZ.pdf),
Bezpečnostní list produktu - *DPG*. Available from www: <http://www.draslovka.cz/data/File/bl/cs/DPG.pdf>,
Bezpečnostní list produktu - *Kyanidy*. Available from www: <http://www.irz.cz/latky/kyanidy>
- [37] REJMAN, M. *Určení technologických parametrů fluidního bioreaktoru s využitím „nanobambulí“ jako nosiče biomasy*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 2009. 82 p.
- [38] KMÍNEK, M.; FINKEOVÁ, J.; NACHTIGALOVÁ, I. *Matematický model biotechnologického procesu*. Automatizace. VŠCHT Praha, 2007, 633-635
- [39] Informační leták ke kyvetovým testům Hach Lange
- [40] Několik zdrojů čistíren odpadních vod: www.cecelovice.cz/vyhlasaky/kanalizacnirad.doc,
www.vodarenska.cz/vaszn/file/smlvla.doc,
http://www.vodovody.lit.cz/site/kanrad_cer.html
- [41] *Bioprocesy* - Technická mikrobiologie. Masarykova univerzita: Přírodovědecká fakulta, 2006. Available from www: <http://sci.muny.cz/>
- [42] *Konduktometr, pH metr, měření redox potenciálu, měřidlo kyslíku*. METREX. Available from www: <http://www.konduktometr.cz/>
- [43] *Měřič koncentrace kyslíku*. INSA s.r.o., Available from www: <http://www.insa.cz/produkty/laboratorni-pristroje/kyslik-1.htm>
- [44] NOVÁK, L. *Protokoly respiračních testů, ČOV Draslovka Kolín* - interní materiál. AQUA-CONTACT Praha v.o.s., 2008
- [45] ZÁVODSKÁ, R. *Biologie buněk*. ISBN 80-86960-15-3,
BERGER, J. *Biologie buněk*. ISBN 80-7232-119-6
- [46] *Modelování bioprocesů: sylabus k předmětu*. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. Available from www: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/model.pdf>
- [47] *Metodiky a postupy mikrobiální ekotoxikologie - Měření aktivit mikroorganismů*. Masarykova universita Brno: Research Centre for Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Available from www: http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/hofman/03_ekotox2.pdf
- [48] *Pomůžte nanovláknem i proti ptaci chřipce*. 21století. Available from www: <http://www.21století.cz/view.php?cislocclanku=2006021702>
- [49] *pH*. Available from www: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselost>

- [50] *TMS měřicí systémy - pH elektrody, redox elektrody, vodivostní elektrody*. Available from www: <http://www.tms-ph.cz/>
- [51] MARŠÍK, F. *Bietermodynamika* – přednášky TUL, předmět Bietermodynamika. Ústav termomechaniky AV ČR, , Bietermodynamika, Academia Praha 1998
- [52] DVOŘÁČKOVÁ, M. *Návody na laboratorní cvičení z předmětu Technologie vody*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí, Available from www: <http://www.geopolymer.cz/uiozp/studmat/200891914848/T7TVO7.pdf>
- [53] *Fyziologie průmyslových mikroorganismů II*: sylabus k předmětu. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. Available from www: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/fyziolII.pdf>